



Catarina Pires Soares

Mestre em Tecnologia e Qualidade Alimentar
Licenciada em Química aplicada – Ramo Orgânica

INFLUÊNCIA DA REDUÇÃO DE SAL NAS PROPRIEDADES DO QUEIJO DE SÃO JOÃO DA ILHA DO PICO

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Qualidade Alimentar

Orientador: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Coorientador: Doutor António Pedro Louro Martins, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária/Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutor Rodrigo Ferrão de Paiva Martins, Professor Catedrático da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Arguentes: Doutora Maria Olívia de Castro Pinho, Professora Catedrática da Faculdade de Ciências de Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto;
Doutora Maria Manuela Estevez Pintado, Professora Auxiliar da Universidade Católica Portuguesa.

Vogais: Doutora Benilde Simões Mendes, Professora Associada, com Agregação, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa;
Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa;
Doutor Nuno Bartolomeu Mendes Godinho de Alvarenga, Professor Adjunto da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja;
Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, Investigadora Principal do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge;
Doutor António Pedro Louro Martins, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária/Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

INFLUÊNCIA DA REDUÇÃO DE SAL NAS PROPRIEDADES DO QUEIJO DE SÃO JOÃO DA ILHA DO PICO

Copyright, Catarina Pires Soares

A Faculdade de Ciencias e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Ana Luísa Fernando, orientadora desta tese, pelo seu apoio e incentivo constantes a nível científico e também a nível pessoal ao longo do trabalho experimental, pela cedência de documentação bibliográfica, pela orientação em termos de práticas laboratoriais, pela total disponibilidade manifestada e pela revisão do documento final.

Ao Professor Doutor Pedro Louro por ter aceite o meu pedido de apoio técnico-científico. Revelou ser o mentor desta tese, pelo seu grande rigor científico e pelo seu sentido prático. Agradeço a sua total disponibilidade, a cedência de documentação bibliográfica, as preciosas sugestões na redação do texto, bem como a leitura crítica do documento original.

À Professora Doutora Benilde Mendes, na qualidade de Coordenadora do Programa Doutoral, pela compreensão e disponibilidade sempre demonstradas.

Ao Professor Doutor Nuno Alvarenga pelo apoio científico na caracterização física das amostras, que revelou ser um complemento muito importante neste trabalho. Na condição de Docente da Escola Superior Agrária de Beja, também disponibilizou todos os meios experimentais para a execução da parte prática supra mencionada.

Ao grupo de Docentes do Programa Doutoral pelos conhecimentos transmitidos.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e especificamente ao Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, por disponibilizar as infraestruturas, os meios técnicos e humanos que permitiram a realização deste trabalho.

Gostaria de fazer um agradecimento muito especial à Queijaria do Pico (Sociedade de Produção de Lacticínios de São João), em particular ao seu proprietário Sr. Rui Amaral, por me ter permitido realizar o fabrico dos queijos experimentais. Gostaria de fazer referência às queijeiras do queijo de São João do Pico, D. Helena Martins e D. Bernardete Gaspar, pela sua preciosa colaboração no fabrico e ainda na preocupação da viragem dos queijos durante a sua maturação.

Aos colegas e amigos, com quem tive a sorte de trabalhar, pelo espírito de entreajuda e pelo apoio laboratorial em diferentes fases do trabalho, em especial, Sara Boléo, Vanessa Bandarra, Nuno Eiras, Bruno Barbosa e aos estagiários Luís Cravo e Márcio Monteiro.

Aos colegas da FCT-UNL que, de uma forma desinteressada, disponibilizaram o seu tempo para a realização das provas sensoriais.

À minha madrinha Dr.^a Fátima Vargas pela leitura cuidada do *abstract*.

A duas grandes Senhoras que me ajudaram imenso numa das alturas mais difíceis da minha vida, sem as quais a realização da parte experimental, bem como da redação do texto não teriam sido possíveis. É com muita estima e consideração que, reconhecidamente, agradeço à Dr.^a Fátima Porto e à D. Lurdes Brigas.

Por fim, aos meus pais pela sua compreensão e pelo seu apoio incondicional.

RESUMO

O sódio é um elemento essencial na alimentação, contudo, o seu consumo em excesso poderá ter efeitos nocivos para a saúde, tais como o aumento na pressão sanguínea e a redução na absorção de cálcio. Devido a estes efeitos, a redução do teor de sódio nos alimentos tem sido uma das prioridades da União Europeia, Austrália e Estados Unidos, nomeadamente no setor dos laticínios onde o queijo é considerado um género alimentício com elevados níveis neste elemento.

A presente dissertação visou o estudo da influência da redução de NaCl por substituição com KCl ou por redução isolada na composição físico-química e mineral e na proteólise, ao longo da maturação do queijo de São João do Pico, nomeadamente ao nível de critérios como a segurança microbiológica, as características sensoriais, as propriedades de textura e parâmetros da cor, avaliados aos 17 dias de cura, período considerado mínimo para a comercialização deste queijo. Os ensaios experimentais englobaram diferentes tratamentos de salga na coalhada: 100% NaCl (amostra controlo, C); substituição (m/m): 3NaCl:1KCl (A1), 1NaCl:1KCl (B1), 1NaCl:3KCl (C1), 100% KCl (D1); redução isolada: 75% NaCl (A2), 50% NaCl (B2), 25% NaCl (C2), e 0% NaCl (D2), do sal utilizado na amostra controlo. Os queijos foram posteriormente curados a 11°C durante 40 dias.

As reduções de sódio por substituição parcial/total com KCl e por diminuição em 25% de NaCl demonstraram ser viáveis para o queijo São João, sem efeitos adversos significativos na sua qualidade global. Os resultados indicaram que os tratamentos de salga aplicados não exerceram efeitos significativos relativamente aos valores médios de humidade, proteína, a_w , gordura, lactose, fósforo, no mesmo período de maturação. Porém, verificaram-se diferenças significativas nos teores de cinza, sódio e potássio entre os queijos experimentais na mesma fase de maturação. O teor em cinza diminuiu significativamente nos queijos experimentais de redução simples e o teor de K aumentou significativamente nas modalidades de substituição, enquanto o teor de sódio reduziu significativamente para ambas as tipologias de salga. As modalidades de ensaio exerceram influências significativas nos valores de pH e da acidez das amostras. Os resultados revelaram ainda que a proteólise foi estatisticamente semelhante nos queijos experimentais e controlo em todas as fases de maturação. A qualidade microbiológica encontra-se dentro dos parâmetros regulamentares e, no geral, não diferiu entre tratamentos de salga.

Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros físicos da dureza, adesividade e coesividade entre queijos experimentais e amostra padrão. As modalidades de redução revelaram uma dureza significativamente superior às modalidades por substituição, e estas últimas revelaram parâmetros de coesividade e adesividade significativamente superiores às primeiras. Verificou-se uma tendência ascendente significativa na dureza e uma tendência significativa descendente nos parâmetros da adesividade e coesividade nos queijos experimentais de redução isolada a partir de 25% NaCl. Adicionalmente, todos os queijos experimentais revelaram ser menos amarelos e possuir maior luminosidade na pasta comparativamente ao queijo convencional, sendo estes efeitos mais acentuados nas modalidades de redução gradual simples de sal.

A avaliação sensorial mostrou que os queijos salgados por substituição parcial/total com KCl não resultaram em produtos diferentes do queijo convencional, enquanto nas amostras respeitantes à redução isolada de sódio acima de 50% NaCl, inclusive, foram detetadas diferenças apreciáveis. Nos tratamentos de salga por substituição não foram identificados efeitos significativos na análise descritiva das variáveis de aceitação de todas as amostras de São João. Pelo contrário, a mesma análise revelou diferenças significativas entre tratamentos de salga por reduções simples superiores a 50% NaCl, nomeadamente, para os atributos da aparência, consistência, sabor e pasta.

Palavras-chave: Queijo São João, redução do teor de sal, sódio, potássio, proteólise, sensorial, perfil de textura.

ABSTRACT

Sodium intake is essential for the welfare of the human being, however, its overconsumption may lead to unhealthy effects, namely blood pressure increase and calcium absorption decrease. Due to the aforementioned effects, sodium content in food is one of the main focuses of attention in European Union, Australia and United States, especially in the dairy sector where cheese is perceived as being a food source high in sodium.

This work aimed at the study of the effect of NaCl reduction by partial or complete replacement with KCl or by reducing the level of added salt *per se* on the physicochemical and mineral composition and on the proteolysis during ripening of São João cheese, particularly in terms of food safety, sensory and textural properties as well as colour parameters, assessed at 17 days of ripening, which is the minimum ripening time required for this cheese. Experimental trials encompassed different curd dry salting treatments, including: NaCl only (control, C); 3NaCl:1KCl (A1), 1NaCl:1KCl (B1), 1NaCl:3KCl (C1) mixtures (w/w), KCl only (D1); 75% NaCl (A2), 50% NaCl (B2), 25% NaCl (C2), e 0% NaCl (D2) of reduced salt level, and then ripened at 11 °C for 40 days.

It was found that partial/total substitution with KCl as well as decreasing the amount added of NaCl in 25% in São João cheese are feasible, without significant adverse effects on its overall quality. No significant effect was observed between control and experimental cheeses regarding moisture, protein, a_w , fat, lactose and phosphorus values at the same storage period. Nevertheless, there were significant differences in ash, sodium and potassium contents among experimental cheeses at the same storage period. Ash content decreased significantly in isolated NaCl reduction experimental cheeses, whereas potassium content increased significantly with the gradual KCl replacement, while sodium content dropped significantly for both types of salting reduction. Moreover, salt treatment had a significant effect on the pH and acidity values of the samples. Still, the results showed that proteolysis was statistically similar in control and experimental cheeses at all sampling ages. The overall microbiological quality remained within the food safety standards and also did not differ among salt treatments.

From the texture profile analysis, no significant differences were found in hardness, adhesiveness and cohesiveness between control and experimental cheeses. Although, cheeses salted with decreasing amounts of NaCl were significantly harder than the cheeses salted with NaCl/KCl mixtures or KCl only, the last ones presenting significantly higher adhesiveness and cohesiveness than the former. Also, it was discerned a significant ascending trend in hardness and a significant descending trend in adhesiveness and cohesiveness for samples with reduction of NaCl levels above 25%. In addition, all experimental cheeses revealed to have less yellowness and higher luminosity in their core when compared to the conventional cheese, being these effects greater in samples with reducing of the amount of salt *per se*.

The sensory evaluation showed that cheeses salted with partial to complete substitution with KCl were not different from the conventional cheese, whereas notable differences were registered in samples concerning decreasing levels of sodium, from 50% included. In salt treatment with substitution of NaCl there was no significant effect on descriptive analysis concerning any of the acceptability variables for all São João cheeses. In counterpart, the same analysis revealed significant differences in cheeses with gradual isolated reduction of NaCl alone above 50%, namely for appearance, firmness, taste and body attributes.

Keywords: São João cheese, reduction of salt content, sodium, potassium, proteolysis, sensory, texture profile.

ÍNDICE

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice	XI
Índice de Figuras	XV
Índice de Tabelas	XVII
Abreviaturas	XIX

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 O Sal e a Saúde Pública	1
1.2 Fabrico de Queijo	4
1.3 Bioquímica da Maturação do Queijo	5
1.3.1 Glicólise da Lactose Residual e Catabolismo do Lactato	5
1.3.2 Metabolismo do Citrato	6
1.3.3 Lipólise e Metabolismo dos Ácidos Gordos	7
1.3.4 Proteólise e Catabolismo de Aminoácidos	7
1.3.4.1 Métodos de Monitorização de Proteólise em Queijo	10
1.3.4.1.1 Extração em Água	10
1.3.4.1.2 Fracionamento da Fração Solúvel em Água	10
1.3.4.1.2.1 Fração Solúvel a pH 4,6	10
1.3.4.1.2.2 Fracionamento com 2 a 12% de Ácido Tricloroacético	11
1.3.4.1.2.3 Fracionamento com 5% Ácido Fosfotúngstico	11
1.3.4.1.3 Formação de Grupos Reativos	11
1.3.4.1.4 Métodos Específicos: Eletroforese e RP-HPLC	11
1.4 Segurança Microbiológica	12
1.5 Salga do Queijo	14
1.5.1 Tipos de Salga	15
1.6 Funções do Sal nos Queijos	17
1.6.1 Aspetos Microbiológicos	17
1.6.2 Efeitos da Desestabilização da Caseína	17
1.6.3 Regulação da Atividade Enzimática	18
1.6.3.1 Enzimas do Coagulante	18
1.6.3.2 Plasmina	19
1.6.3.3 Flora microbiana	20
1.6.4 Efeitos nas Propriedades Físicas do Queijo	20
1.7 Queijos com Teor Reduzido em Sódio: Implicações na Tecnologia e Implicações Sensoriais	22

1.7.1 Processamento com Redução de NaCl	23
1.7.2 Processamento com Substituição de NaCl	24
1.7.3 Implicações Sensoriais	30
1.8 Queijos Tradicionais	32
1.9 Enquadramento do Trabalho e Objetivos	37
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	39
2.1 Metodologia	39
2.2 Fabrico do queijo	39
2.3 Amostragem	40
2.4 Métodos	43
2.4.1 Análises físico-químicas	43
2.4.1.1 Humidade e a_w	43
2.4.1.2 Cinza	43
2.4.1.3 Azoto total e proteína bruta	44
2.4.1.4 Cloretos	44
2.4.1.5 Gordura	44
2.4.1.6 Lactose	45
2.4.1.7 pH	46
2.4.1.8 Acidez	46
2.4.1.9 Elementos minerais	46
2.4.1.10 Fósforo total	46
2.4.2 Avaliação da proteólise	47
2.4.2.1 Azoto solúvel em água (WSN)	47
2.4.2.2 Azoto não proteico (TCASN)	47
2.4.2.3 Azoto aminoacídico (PTASN)	47
2.4.2.4 Azoto amoniacal (NH_3)	48
2.4.3 Análises Microbiológicas	48
2.4.4 Propriedades físicas	50
2.4.4.1 Análise de Perfil de Textura	50
2.4.4.2 Cor	50
2.4.5 Análise Sensorial	51
2.4.5.1 Prova Triangular	51
2.4.5.2 Avaliação hedónica	52
2.4.6 Análise Estatística	53
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	55
3.1 Traçado Experimental	55
3.2 Propriedades composicionais e físico-químicas	56
3.3 Microbiologia	79
3.4 Avaliação do Efeito nas Frações Azotadas na Proteólise	82
3.5 Propriedades Físicas	92

3.5.1 Análise de Perfil de Textura	92
3.5.2 Cor	93
3.6 Avaliação Sensorial	96
3.6.1 Prova Triangular	96
3.6.2 Avaliação Hedónica	97
Capítulo 4 - Conclusão	101
Capítulo 5 - Bibliografia	105
ANEXO I.A – Ficha de provas do teste do triângulo.	115
ANEXO I.B – Teste de Aceitação ao queijo de São João.	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Proteólise e catabolismo dos aminoácidos ao longo da maturação do queijo (McSweeney, 2004).	9
Figura 1.2 - Queijo de São João fabricado na Queijaria do Pico (Sociedade de Produção de Laticínios de São João) assente sobre follas de roca	33
Figura 1.3 - Diagrama de fluxo do queijo São João produzido na Queijaria do Pico.	34
Figura 2.1 – Várias etapas do fabrico do queijo de São João na Queijaria do Pico (Sociedade de Produção de Laticínios de São João) (setembro, 2011). Da esquerda para a direita apresentam-se as principais etapas de fabrico, nomeadamente: receção, coagulação, dessoramento, salga nos grãos da coalhada, encinchamento, prensagem e maturação.	40
Figura 2.2 – Esquema de fabrico dos queijos controlo e experimentais a partir dos três lotes de leite trabalhado.	41
Figura 2.3 – Ficha de prova quantitativa utilizada para obtenção da aceitação comercial do produto (1 = desgosto totalmente a 9 = gosto totalmente).	53
Figura 3.1 – Valores médios \pm desvio padrão de humidade obtidos no lote A relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	60
Figura 3.2 – Valores médios \pm desvio padrão de humidade obtidos no lote B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	60
Figura 3.3 – Valores médios \pm desvio padrão de proteína obtidos no lote A relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	61
Figura 3.4 – Valores médios \pm desvio padrão de proteína obtidos no lote B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	61
Figura 3.5 – Valores médios \pm desvio padrão de humidade obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.	61
Figura 3.6 – Valores médios \pm desvio padrão de proteína obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.	62
Figura 3.7 – Valores médios \pm desvio padrão de teor em sal obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	63
Figura 3.8 – Valores médios \pm desvio padrão de cinza obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	63
Figura 3.9 – Valores médios \pm desvio padrão do teor em sal obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.	64
Figura 3.10 – Valores médios \pm desvio padrão de cinza obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.	64
Figura 3.11 – Valores médios \pm desvio padrão da acidez obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	68
Figura 3.12 – Valores médios \pm desvio padrão de pH obtidos no lote A (em cima) e no lote B (em baixo) relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	69

Figura 3.13 – Valores médios \pm desvio padrão da acidez obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.	70
Figura 3.14 – Valores médios \pm desvio padrão do pH obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.	70
Figura 3.15 – Valores médios \pm desvio padrão da atividade da água obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.	71
Figura 3.16 – Valores médios \pm desvio padrão de fósforo obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.	74
Figura 3.17 – Valores médios \pm desvio padrão de fósforo obtidos nos lotes A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	75
Figura 3.18 – Valores médios \pm desvio padrão de cálcio e magnésio obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.	76
Figura 3.19 – Valores médios \pm desvio padrão de cálcio (em cima) e magnésio (em baixo) obtidos nos lotes A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	77
Figura 3.20 – Valores médios \pm desvio padrão de sódio obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	78
Figura 3.21 – Valores médios \pm desvio padrão de potássio obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.	78
Figura 3.22 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para azoto total (TN) expresso em % de massa seca (m.s.); e para azoto solúvel em água (WSN), azoto solúvel em 12% TCA (TCASN), azoto solúvel em 5% PTA (PTASN) e azoto amoniacal (NH ₃), todos expressos em % TN, obtidos no queijo São João para os lotes A e B ao longo da maturação.	83
Figura 3.23 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para o azoto total (TN), expresso em % de massa seca (m.s.); e para azoto solúvel em água (WSN), azoto solúvel em 12% TCA (TCASN) e azoto solúvel em 5% PTA (PTASN), todos expressos em % TN, obtidos no queijo São João para o lote A, relativos aos tratamentos da salga aplicados, ao longo da maturação.	87
Figura 3.24 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para o azoto total (TN) expresso em % de massa seca (m.s.); e para azoto solúvel em água (WSN), azoto solúvel em 12% TCA (TCASN) e azoto solúvel em 5% PTA (PTASN), todos expressos em % TN, obtidos no queijo São João para o lote B, relativos aos tratamentos da salga aplicados, ao longo da maturação.	88
Figura 3.25 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para o azoto amoniacal (NH ₃), expresso em %TN, obtido no queijo São João para o lote A, relativo aos tratamentos da salga aplicados, ao longo da maturação.	91
Figura 3.26 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para o azoto amoniacal (NH ₃), expresso em %TN, obtido no queijo São João para o lote B, relativo aos tratamentos da salga aplicados, ao longo da maturação.	91
Figura 3.27 – Perfil sensorial obtido no queijo São João relativamente aos tratamentos da salga aplicados aos 17 dias de maturação.	100

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Critérios obrigatórios de segurança.	13
Tabela 1.2: Critérios analíticos – germes indicadores de falta de higiene.	13
Tabela 1.3: Alguns parâmetros caracterizadores da tecnologia de fabrico dos diversos queijos estudados (Sá & Barbosa, 1990; Fox <i>et al</i> , 2004).	28
Tabela 3.1: Codificação identificativa alfanumérica atribuída aos queijos experimentais.	55
Tabela 3.2: Composição química do queijo São João salgado com NaCl ou misturas de NaCl/KCl ou KCl apenas, durante a maturação.	57
Tabela 3.3: Evolução dos parâmetros físico-químicos durante a maturação do queijo São João salgado com NaCl ou misturas de NaCl/KCl ou KCl.	66
Tabela 3.4: Evolução do teor de mineral durante a maturação do queijo São João salgado com NaCl ou misturas de NaCl/KCl ou KCl apenas.	72
Tabela 3.5: Determinações microbiológicas do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.	79
Tabela 3.6: Propriedades texturais do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.	92
Tabela 3.7: Parâmetros da cor relativos à pasta e à crosta do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.	94
Tabela 3.8: Prova triangular aplicada ao lote A do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.	96
Tabela 3.9: Teste do triângulo aplicado ao lote B do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.	97
Tabela 3.10: Propriedades sensoriais do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, no lote C, aos 17 dias de maturação.	98

ABREVIATURAS

a_w	atividade da água
c.	cerca de
°C	Graus Celsius
Da	dalton
EC	Eletroforese capilar
HACCP	“Hazard Analysis and Critical Control Points” (Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos)
meq.	n.º miliequivalentes
PAGE	“Polyacrylamide gel electrophoresis” (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
p.ex.	por exemplo
PTA	“Phosphotungstic acid” (ácido fosfotúngstico)
PTASN	“Phosphotungstic acid soluble-nitrogen” (azoto solúvel em ácido fosfotúngstico, vulgo, azoto aminoacídico)
RP-HPLC	“Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography” (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa)
TCA	“Trichloroacetic acid” (ácido tricloroacético)
TCASN	“Trichloroacetic acid soluble-nitrogen” (azoto solúvel em ácido tricloroacético, vulgo, azoto não proteico)
TN	“Total Nitrogen” (azoto total)
TPA	“Texture Profile Analysis” (Análise de Perfil de Textura)
WSN	“Water soluble-nitrogen” (azoto solúvel em água)

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Atualmente, o teor de sal nos alimentos é um dos principais focos de atenção da indústria alimentar a nível mundial, em particular nos setores dos laticínios, das carnes e dos cereais. Estes setores estão a ser impelidos a reduzir o teor em sal através de campanhas realizadas pelos departamentos de saúde pública e mediante alertas de saúde disseminados pelos meios de comunicação social.

Sendo o queijo considerado um género alimentício com elevados níveis de sódio, fator que desencoraja o consumo de queijo, julga-se que reduzir o conteúdo em sódio neste produto poderá contribuir para a redução do consumo geral de sódio pelos consumidores (Agarwal *et al.*, 2011), representando, adicionalmente, um enorme desafio para a indústria de laticínios, uma vez que o sal exerce funções específicas no sabor, textura e extensão do tempo de prateleira (Ayyash *et al.*, 2011; Ayyash & Shah, 2010; Guinee & Fox, 2004; Katsiari *et al.*, 1997 e 2000; Liem *et al.*, 2011).

1.1 O Sal e a Saúde Pública

O sal contém sódio, componente mais abundante nos fluidos extracelulares e que permite o transporte de nutrientes, sendo a sua ingestão essencial pela contribuição nos mecanismos de regulação da pressão sanguínea, de transporte de água intracelular, de regulação da pressão osmótica e de transmissão de impulsos nervosos (Liem *et al.*, 2011; Wyatt, 1983). O consumo máximo diário recomendado para adultos é de aproximadamente de 2,4 g Na ou 6 g NaCl, o qual pode ser encontrado naturalmente nos alimentos (Ayyash & Shah, 2010). Contudo, nos países desenvolvidos, a ingestão média na dieta alimentar do consumidor é de 4-5 g de sódio (10-12 g de cloreto de sódio) por dia (Drake *et al.*, 2011), sendo vista como excessiva, uma vez que a ingestão de Na presente no sal utilizado é no mínimo duas a três vezes superior à ingestão diária recomendada; pode mesmo ser perigosa em termos de saúde pública por poder provocar hipertensão e o aumento da excreção de cálcio, com condução concomitante à osteoporose (Katsiari *et al.*, 1997 e 2000; Guinee & Fox, 2004; Ayyash *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2011; Liem *et al.*, 2011).

Em 2008, a Comissão Europeia estabeleceu um procedimento geral para a redução de sal. Esta iniciativa visa contribuir para a redução do consumo dos níveis de NaCl pelas populações, para a consecução das recomendações estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde e que respeitam a um limite de ingestão de sal não superior a 5g/dia/adulto, e tem como um dos principais objetivos uma redução total do sal em 16% nos próximos 4 anos seguintes, a partir dos níveis de sal avaliados no ano de 2008. Numa primeira fase, as atividades centrar-se-ão em quatro categorias de géneros alimentícios: 1. produtos cárneos, 2. pão, 3. queijo, e 4. refeições (restauração e *catering*). A participação dos Estados Membros neste procedimento geral comum é voluntária (Zanardi *et al.*, 2010). Alguns dos Estados Membros participantes são a Itália, Reino Unido, Irlanda, França, Finlândia, Espanha (Health and Consumers DG, 2008).

Por analogia, as organizações de saúde dos EUA propuseram metas a cumprir na redução gradual do teor em sódio em alguns géneros alimentícios. Esta iniciativa tem como objetivo reduzir o sal na restauração e no *catering* em 25% nos 5 anos subsequentes a 2009, sendo expectável uma redução nacional da ingestão de sal em 20%. De notar que uma iniciativa semelhante no Reino Unido conduziu a reduções de sal de 40% ou mais em alguns produtos alimentares (Agarwal *et al.*, 2011).

A gama do conteúdo de sal no queijo varia de 0,7% no tipo Suíço a aproximadamente 8% em queijos conservados em salmoura. Por conseguinte, os consumidores procuram formas para restringir a ingestão diária de sódio, incrementando assim a procura de alimentos e queijos com teores reduzidos neste elemento (Ayyash & Shah, 2010), ou evitando, inclusive, o consumo de queijo. Contudo, o desenvolvimento de queijos que contribuam para atenuar questões relacionadas com a saúde pública é um desafio para a indústria de lacticínios visto que quando a concentração de sal em queijos é reduzida, podem verificar-se aumentos na proteólise, na atividade da água, na acidez e no amargor, e redução na firmeza, ocorrendo também fermentações irregulares (Ayyash & Shah, 2010). Considerando que o consumo de queijo está a aumentar a nível mundial, devia ser dada importância à redução do teor de sódio no queijo sem afetar o seu consumo (Cruz *et al.*, 2011). Consequentemente, a substituição de cloreto de sódio por outro sal é considerado uma aproximação alternativa na redução de sódio em queijos (Ayyash & Shah, 2010). Vários tipos de queijo com teor reduzido de sódio têm sido desenvolvidos mediante a redução de NaCl, por si só, ou por substituição parcial/total deste sal por KCl, MgCl₂ e CaCl₂. De um modo geral, os resultados são positivos, sendo a maioria das variedades dos queijos aceitável. Porém, por vezes é possível detetar um sabor amargo residual resultante da substituição do NaCl. Na sequência destes estudos (Guinee & Fox, 2004; Lindsay *et al.*, 1982), o cloreto de potássio (KCl) tem sido reconhecido como o substituto potencial do cloreto de sódio, sendo que a mistura NaCl:KCl tem sido usada com sucesso em vários queijos, sem qualquer efeito adverso na qualidade do queijo, tais como o Feta, o Kefalograviera, e o Cheddar (Ayyash & Shah, 2010).

Devido aos efeitos negativos na saúde provocados pela ingestão do sal, tais como o aumento na pressão sanguínea, associada a doenças cardiovasculares, a redução na absorção de cálcio com a formação de cálculo renal (“pedra nos rins”) composto por cálcio, com o subsequente aumento do risco de osteoporose, o elevado consumo de sal através dos alimentos é uma questão de relevo na sociedade moderna (Ayyash *et al.*, 2011; Guinee & Fox, 2004; Katsiari *et al.*, 1997 e 2000; Liem *et al.*, 2011). Sabe-se que a elevada ingestão de sódio interfere na biodisponibilidade do cálcio devido à excreção renal deste mineral (Cruz *et al.*, 2011). De acordo com equações preditivas, assume-se que a excreção urinária do cálcio aumenta de 30 a 40 mg, para cada 2 g de sódio consumido. Não obstante, se a ingestão de sódio é inferior a 2,4 g por dia, não haverá impacto negativo na estrutura óssea. Além disso, é observado, para mulheres na pós-menopausa, que uma dieta restrita em sódio (até 2 g por dia) pode ser benéfica para a manutenção da massa óssea e subsequente prevenção da osteoporose (Cruz *et al.*, 2011). Acresce ainda que é aceite que pessoas que consomem produtos

lácteos ingerem mais nutrientes e exibem ossos mais saudáveis quando comparado com pessoas que não consomem este tipo de produtos (Cruz *et al.*, 2011).

As Linhas Guia da Dieta enfatizam que o impacto da ingestão elevada em sódio através da alimentação pode ser reduzido se se aumentar a ingestão de potássio, naturalmente presente em batatas, cenouras, feijão, fruta e outros hortícolas. Estudos epidemiológicos e clínicos indicam que a ingestão de potássio tem um papel importante na hipertensão arterial em indivíduos hipertensos. A ingestão de sódio e potássio tem efeitos antagonistas na pressão arterial, que se traduzem em resultados benéficos quando a ingestão de sódio diminui e a ingestão de potássio aumenta (Cruz *et al.*, 2011).

No corpo humano, tanto o sódio como o potássio influenciam o metabolismo da água e estimulam atividades neuromusculares. De acordo com recomendações nutricionais, o rácio adequado de Na/K na dieta deve ser de 0,5 para crianças e 0,6 para adultos (Reps *et al.*, 2009). Num estudo que correlacionava a pressão sanguínea com ingestão de cálcio e o rácio Na/K, foi observado que a proporção Na/K está mais fortemente associada com a pressão sanguínea do que qualquer outro nutriente (incluindo Na). Também foi verificado que uma ingestão adequada de cálcio protege contra efeitos de hipertensão, numa dieta com consumo elevado em Na ou com consumo baixo em K e que a ingestão de produtos lácteos e de cálcio ajudam a manter a pressão arterial nos níveis normais (Cruz *et al.*, 2011).

Em suma, diversos estudos indicam que um aumento da ingestão de potássio pela dieta pode exercer um efeito protetor em indivíduos com hipertensão induzida pelo sódio, tendo sido estimado que uma redução de 2,9 g por dia de sal na dieta da população ocidental decresceria os níveis de mortalidade causados por acidente vascular cerebral, de aproximadamente 22%, e por isquemia cardíaca, de cerca de 16% (Williams *et al.*, 2003), bem como contribuiria para a redução da excreção renal do cálcio e, conseqüentemente, conferiria proteção à massa óssea, por prevenção da osteoporose (Katsiari *et al.*, 2000).

Apesar da gravidade do problema e do trabalho constante na consciencialização pública, uma redução no teor do sal em alimentos processados constitui um enorme desafio para a indústria devido às limitações nas características sensoriais, bem como nas propriedades funcionais e na segurança microbiológica dos produtos por ela produzidos e comercializados (Liem *et al.*, 2011), para além do fato de o sal ser um dos ingredientes mais baratos na indústria alimentar. A introdução de produtos com reduzido teor em sódio deve ser cuidadosamente estudada de modo a que o desempenho e o sabor dos produtos com teor reduzido em sal sejam semelhantes aos respetivos alimentos convencionais (Guinee & Fox, 2004).

Pese embora pesquisas de mercado indicarem que os consumidores são pró-ativos relativamente à aquisição de produtos saudáveis, o sabor continua a ser o fator preponderante na decisão de compra.

Tem sido reportado que os consumidores vêem os produtos baixos em sódio como tendo um sabor muito atenuado, insípido, e até enfadonho. Acresce ainda que uma dieta rica em sódio, cuja fonte principal provém da adição de NaCl, pode conduzir a que os consumidores tenham uma preferência por alimentos ricos em sódio (Drake *et al.*, 2011). Assim, devido a uma elevada exposição ao sódio, os consumidores irão provavelmente notar uma redução de 25% em Na na maioria dos produtos; consequentemente, a indústria alimentar tem anunciado reduzir lentamente o sal nos produtos, ao longo do tempo, com o objetivo de manter a fidelização dos clientes (Drake *et al.*, 2011).

Atualmente, estudos demonstram que diferentes quantidades de sódio poderão ser removidas de diferentes produtos alimentares sem que os consumidores notem diferenças na sua palatabilidade, dependendo de fatores intrínsecos ao alimento como a gordura, viscosidade e sua microestrutura (Drake *et al.*, 2011). No caso específico do queijo, a complexidade da matriz proteica parece ajudar a mascarar reduções de sódio. Contudo, reduzir o sódio de forma significativa pode custar à indústria láctea a fidelização de clientes visto que uma motivação inerente ao consumo deste produto é o sabor salgado. Uma redução diminuta de sódio (<18%) no caso particular do queijo não seria necessariamente notada pelo consumidor (Drake *et al.*, 2011). Por outro lado, um aumento na lista de aditivos na rotulagem devido à substituição do NaCl e à adição de potenciadores de sabores contrabalança as tendências de consumo (Cruz *et al.*, 2011; Drake *et al.*, 2011).

1.2 Fabrico de Queijo

A produção de queijo é uma forma de preservar os nutrientes do leite cru, alimento de alto risco extremamente perecível. O processo baseia-se essencialmente na desidratação e acidificação, no qual a proteína e a matéria gorda são concentradas em 6–12 vezes e o pH reduzido de aproximadamente de 6,6 no leite fresco para um pH final no queijo de 4,6–5,4 (Cruz *et al.*, 2011).

A produção da maioria das variedades de queijo engloba a combinação de quatro ingredientes: leite, coagulante, microrganismos e sal, os quais são processados através de um número comum de etapas como a formação da coalhada, drenagem do soro, produção de ácido mediante um processo de fermentação, e salga, seguidas de um período de maturação (Sousa *et al.*, 2001). O gel formado pela coagulação do leite é cortado e trabalhado de modo a remover o soro num processo conhecido como sinérese, podendo ser ainda submetido a prensagem. As alterações que ocorrem durante a maturação, no sabor, aroma e textura de queijos curados são determinados pelo processo de produção, especialmente pelos níveis de humidade, adição de NaCl, pH, atividade do coagulante residual, tipo de fermentos lácteos e microflora secundária (Correia *et al.*, 2008; Fox & McSweeney, 2004).

O queijo é, em termos bioquímicos, um produto dinâmico que sofre mudanças significativas durante o período de maturação. A proteína, a lactose e a gordura são metabolizadas pela ação do coagulante residual e das enzimas endógenas do leite, e pela atividade microbiana resultante dos fermentos

lácteos e microflora secundária. A proteólise (degradação da matriz caseínica a uma gama de péptidos de dimensões variadas e aminoácidos livres) desempenha um papel fundamental na formação da textura e sabor e aroma dos queijos. Outras reações bioquímicas como a lipólise (libertação de ácidos gordos livres), glicólise (metabolismo residual da lactose e citrato) e a formação de compostos voláteis são também de extrema importância no desenvolvimento dos compostos sápidos e aromáticos (McSweeney, 2004).

Os queijos variam na sua composição no que respeita aos nutrientes constituintes, como proteínas, lípidos, glúcidos, minerais, cálcio, fósforo e vitaminas A e B. O queijo é um dos produtos alimentares mais nutritivos contendo elevados teores de gordura e de proteína. O cálcio, que está normalmente presente em grandes quantidades no queijo, tem efeitos benéficos no combate à hipertensão, osteoporose e problemas dentários. Para além do cálcio, outros elementos, tais como péptidos bioativos, atribuem ao queijo propriedades potencialmente anticancerígenas. Devido à sua riqueza nutricional, o queijo desempenha um papel importante na alimentação de indivíduos de todas as idades, sendo reconhecido como um dos melhores produtos alimentares, não só pelo seu valor nutricional, mas também pela sua vasta variedade de propriedades, sabores e formatos (Cruz *et al.*, 2011).

1.3 Bioquímica da Maturação do Queijo

A maturação consiste numa série de processos físicos, bioquímicos e microbiológicos, que ocorre em todos os queijos, à exceção daqueles que são consumidos frescos. A maturação é feita, na maioria dos casos, em câmaras de cura com controlo da temperatura e dos níveis de humidade. O tempo de maturação varia em função do tipo de queijo, podendo ir de poucas semanas a muitos meses, e é neste processo que se desenvolvem as características organoléticas e de textura, específicas consoante o queijo (Perry, 2004).

As reações bioquímicas que ocorrem no queijo durante a maturação estão geralmente agrupadas em quatro categorias maioritárias: 1) glicólise da lactose residual e catabolismo do lactato; 2) catabolismo do citrato, o qual é de extrema relevância em determinadas variedades; 3) lipólise e catabolismo dos ácidos gordos livres; e 4) proteólise e catabolismo dos aminoácidos (McSweeney, 2004).

1.3.1 Glicólise da Lactose Residual e Catabolismo do Lactato

Os grãos que compõem a coalhada contêm teores residuais de lactose, açúcar metabolizado rapidamente a lactato, nos estádios iniciais da maturação, que é subsequentemente catabolizado segundo diversas vias metabólicas. Apesar de crucial para a produção de queijo, o metabolismo da lactose a lactato fica praticamente completo no final do fabrico ou durante a fase inicial da cura. A maior parte da lactose do leite é perdida no esgotamento do soro (deslactosagem), e o remanescente

fica retido na coalhada onde é rapidamente metabolizado, à posteriori. A acidificação, conjuntamente com a capacidade tampão da coalhada, influencia o pH, o crescimento da flora microbiana secundária e a atividade enzimática na maturação. De notar que a inibição da produção de ácido láctico é particularmente súbita nas variedades salgadas diretamente na massa (p.ex., Cheddar) onde a concentração de NaCl atinge o equilíbrio muito mais rapidamente comparativamente aos queijos salgados em salmoura (McSweeney & Fox, 2004).

O catabolismo do lactato ocorre provavelmente em todos os queijos e é particularmente importante em variedades que permitem o desenvolvimento de bolor ou flora microbiana à superfície (p.ex., Camembert) e em queijo de tipo Suíço. Neste último, o lactato é catabolizado por *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* a propionato, acetato, H₂O e CO₂; os primeiros dois produtos contribuem para o sabor do queijo Suíço e o CO₂ migra através da matriz do queijo em direção a pontos mais debilitados, nos quais são formados os olhos característicos. O catabolismo oxidativo do lactato a acetato, H₂O e CO₂ por *Penicillium camemberti* à superfície de queijos Camembert e Brie é de enorme importância para a sua maturação. Assim, o catabolismo do ácido láctico provoca um incremento considerável no pH da superfície destes queijos que se traduz num gradiente de pH da superfície em direção ao interior centro e na migração do lactato para a superfície. O metabolismo oxidativo do lactato é de grande relevância em queijos curados com auxílio de flora microbiana superficial (p.ex., Tilsit ou Limburger), nos quais as leveduras, na fase inicial de cura, desacidificam a superfície permitindo o crescimento de bactérias Gram-positivas características (McSweeney & Fox, 2004).

No que concerne à segurança alimentar, a lactose é uma substância que quando presente no alimento pode ser fonte de alergias alimentares ou intolerâncias no consumidor, pois o organismo humano, por vezes, não possui níveis adequados de β -galactosidase, o que resulta numa má digestão deste glúcido (Serras, 2010; DL 126/2005). Acresce ainda que está estabelecido que existe um declínio gradual da atividade da lactase com a idade (Serras, 2010). Apesar de o queijo ser considerado um produto lácteo pobre em lactose, quando este açúcar está presente em concentrações mínimas detetáveis, no momento da sua comercialização, o mesmo deverá ser indicado no rótulo designadamente na lista dos ingredientes, tendo em vista a proteção da saúde pública, de acordo com o ponto 7 do anexo do Decreto-Lei 156 de 7 de agosto de 2008 que altera o anexo III-A do Decreto-Lei 126 de 5 de agosto de 2005.

1.3.2 Metabolismo do Citrato

A relativa baixa concentração do citrato no leite contradiz a importância do seu metabolismo em muitos queijos que são feitos com fermentos lácteos mesófilos. Aproximadamente 94% do citrato é hidrossolúvel e a sua maioria perde-se no lactossoro, sendo que o restante permanece presumivelmente na forma de citrato coloidal (McSweeney & Fox, 2004).

O citrato é metabolizado pelas estirpes de lactococci citrato-positivas (Cit⁺) na presença de açúcares fermentescíveis (p.ex., lactose), com a produção de diacetilo, acetato, acetoína e CO₂. O citrato não é metabolizado por bactérias lácticas termófilas e pela maioria das estirpes de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ou *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. O CO₂ decorrente do metabolismo do citrato é responsável pelos olhos característicos dos queijos de tipo Alemão e por defeitos indesejados, como a formação de bolsas de gás na massa de certos queijos. O metabolismo do citrato também é muito significativo no desenvolvimento do sabor e aroma nos queijos Cottage e Quarg devido à formação de diacetilo (McSweeney & Fox, 2004).

1.3.3 Lipólise e Metabolismo dos Ácidos Gordos

A gordura do leite é essencial para o desenvolvimento do sabor e aroma dos queijos, sendo a lipólise um processo bioquímico importante que decorre durante a cura do queijo. Sob a atividade de lipases microbianas e da lipase lipoproteica endógena do leite, tem lugar a hidrólise enzimática dos triacilgliceróis a ácidos gordos e glicerol, mono- ou diacilgliceróis (McSweeney & Sousa, 2000). Os ácidos gordos livres têm um impacto direto nas características organoléticas de muitas variedades de queijo, em particular os ácidos que apresentam cadeias constituídas por 4 a 10 carbonos (McSweeney, 2004). A referir que a atividade lipolítica é mais significativa em queijos de leite cru do que queijos de leite pasteurizado, uma vez que as lipases são extensamente inativadas por tratamento térmicos (McSweeney, 2004).

Os ácidos gordos livres resultantes da lipólise sofrem oxidação, sendo precursores necessários à síntese de variadíssimos componentes, tais como metilcetonas, lactonas, ésteres, alcanos e álcoois secundários, que contribuem diretamente para as características organoléticas do queijo (Gripon *et al.*, 1991; Fox & Wallace, 1997; McSweeney & Sousa, 2000).

1.3.4 Proteólise e Catabolismo de Aminoácidos

A proteólise é o fenómeno bioquímico mais complexo que ocorre durante a maturação da maioria dos queijos curados. Para além de influenciar a textura do queijo, a proteólise influencia o desenvolvimento do sabor e aroma via formação de péptidos e aminoácidos, os quais contribuem diretamente para as características organoléticas típicas do queijo. A proteólise pode ser considerada em duas fases. A proteólise inicial das caseínas, também designada por proteólise primária, tem início na cuba de coagulação e estende-se ao longo da maturação, sendo provocada, fundamentalmente, pelas enzimas do coagulante residual e eventualmente pela plasmina, na qual há a produção de péptidos longos, insolúveis em água, e médios, solúveis em água, que podem ser posteriormente degradados (Freitas & Malcata, 2000). Representa a extensão da desagregação da caseína nativa, sendo estimada por eletroforese (Upadhyay *et al.*, 2004). A proteólise secundária ocorre essencialmente durante a maturação, pela ação das proteases e peptidases dos fermentos lácteos e da flora microbiana láctica e/ou secundária, e corresponde à degradação subsequente dos

péptidos em péptidos de cadeia curta e aminoácidos livres (Freitas & Malcata, 2000; Upadhyay *et al.*, 2004). Estes compostos são medidos, quantitativamente, por extração e subsequente fracionamento do azoto e análise das respetivas frações azotadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Upadhyay *et al.*, 2004). Os compostos anteriormente referidos podem contribuir diretamente para o sabor e aroma dos queijos ou, em alternativa, podem servir como precursores para a síntese de compostos orgânicos de dimensões reduzidas, associados a sabor e aroma muito intensos (Upadhyay *et al.*, 2004).

A proteólise contribui para a palatabilidade do queijo mediante a produção de péptidos e aminoácidos livres e substâncias sápidas, em geral facilmente extraídas para a fração aquosa, na qual são solúveis. Os péptidos longos não contribuem diretamente para as características organoléticas do queijo, mas são importantes para o desenvolvimento correto da textura; porém, péptidos de cadeia longa podem ser hidrolisados por proteases a péptidos mais curtos, os quais podem acusar sabor (Sousa *et al.*, 2001). Adicionalmente aos péptidos, um número de outros compostos químicos podem contribuir para o sabor amargo no queijo, tais como, aminoácidos, aminas, amidas, amidas substituídas, cetonas de cadeia longa e alguns monoglicerídeos (Adda *et al.*, 1982). Engels e Visser (1994) sugeriram que compostos com baixo peso molecular (< 500 Da, ou seja, péptidos curtos, aminoácidos, ácidos gordos livres ou os seus produtos catabólicos) eram responsáveis pela palatabilidade básica do queijo.

O amargor nos queijos deve-se frequentemente à formação de péptidos hidrófobos, sendo geralmente considerado como defeito no sabor. Estes péptidos são produzidos, fundamentalmente, pela ação das enzimas do coagulante e dos fermentos lácticos, sendo o sabor amargo detetado nos queijos quando os péptidos hidrófobos atingem concentrações excessivas, tanto como resultado de uma sobreprodução ou como de uma degradação inadequada causada por proteases microbianas. Determinadas sequências nas caseínas são hidrófobas e, quando sujeitas à excisão por enzimas proteolíticas, podem dar origem a sabores amargos. Péptidos amargos da caseína α_{s1} são predominantemente das regiões dos resíduos de 14-34, 91-101 e 143-151, enquanto péptidos amargos resultantes da hidrólise da caseína β são maioritariamente da região dos resíduos compreendidos entre 46-90 (Sousa *et al.*, 2001). Os queijos com baixos teores de gordura apresentam maior propensão para desenvolver o carácter amargo, talvez porque, nos queijos gordos, os péptidos amargos hidrófobos provavelmente são menos detetáveis por se localizarem na fase lipídica. De notar que fatores como o pH e sal podem reduzir o amargor no queijo, uma vez que podem inibir a atividade do coagulante e das proteases e peptidases microbianas (Sousa *et al.*, 2001).

Os produtos finais da proteólise, os aminoácidos, contribuem diretamente para o sabor do queijo visto que alguns aminoácidos têm sabor doce (Gly, Ser, Thr, Ala, Pro), ácido (His, Glu, Asp) ou amargo (Arg, Met, Val, Leu, Phe, Tyr, Ile, Trp); a sua concentração depende da variedade do queijo e resulta da libertação de aminoácidos das caseínas por proteólise e do seu catabolismo ou transformação

noutros aminoácidos pela flora microbiana presente no queijo produzindo muitos compostos voláteis importantes no sabor e aroma dos queijos (McSweeney, 2004).

O catabolismo dos aminoácidos parece dar-se segundo duas vias metabólicas (Figura 1.1): por reações de transaminação e por reações de eliminação. As aminotransferases catalisam a transferência do grupo α -amino de um aminoácido para um α -ceto ácido (usualmente α -cetoglutarato) com a produção do aminoácido correspondente e um α -ceto ácido correspondente ao substrato do aminoácido. A segunda via metabólica que é iniciada por reações de eliminação é particularmente importante na produção de compostos sulfurados voláteis da cadeia lateral de metionina. Adicionalmente, as descarboxilases removem o grupo carboxílico dos aminoácidos para produzir aminas. As descarboxilases podem também atuar com α -ceto ácidos para produzir aldeídos, os quais podem ser oxidados a ácidos carboxílicos ou reduzidos a álcoois primários. O grupo α -amino dos aminoácidos pode ser removido pela ação das desaminases, com a formação de ácido carboxílico e amónia. Adicionalmente, as cadeias laterais de aminoácidos podem ser degradadas pela ação de várias aminolases (McSweeney, 2004).

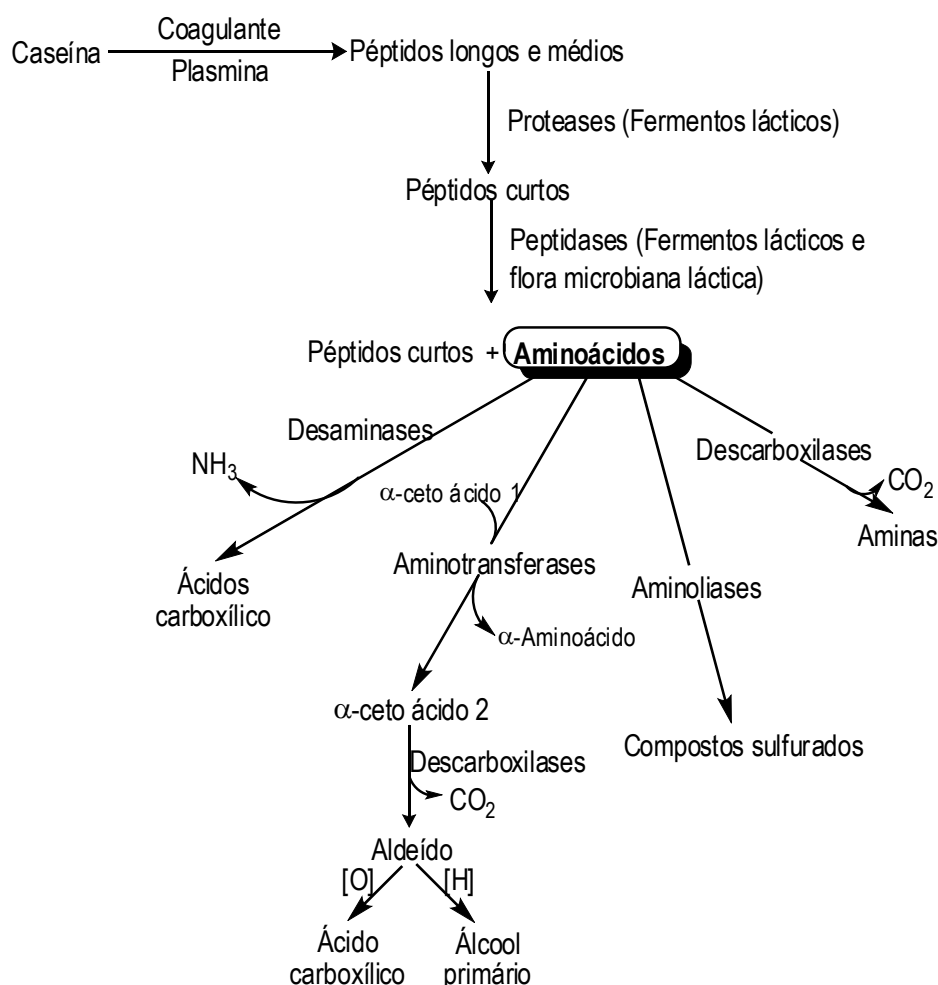


Figura 1.1 – Proteólise e catabolismo dos aminoácidos ao longo da maturação do queijo (McSweeney, 2004).

1.3.4.1 Métodos de Monitorização de Proteólise em Queijo

Têm sido desenvolvidas técnicas analíticas para a avaliação da proteólise no queijo. Estes métodos podem ser classificados em métodos não-específicos e específicos. Os métodos não-específicos, os quais fornecem informação sobre a extensão da proteólise e a atividade dos agentes proteolíticos, incluem a determinação do azoto solúvel em (ou extraído por) vários solventes proteicos ou precipitantes, pelo método Kjeldahl (Upadhyay *et al.*, 2004).

1.3.4.1.1 Extração em Água

A fração solúvel em água (WSN) é uma mistura complexa de péptidos longos, médios e curtos e aminoácidos, resultantes da ação proteolítica das enzimas coagulantes do leite, proteases endógenas do leite, fermentos lácticos, e flora microbiana secundária ou adventícia. A WSN expressa como percentagem do azoto total (TN) aumenta ao longo da cura e corresponde ao coeficiente de maturação, sendo definida por muitos autores como a extensão da proteólise. O método de Kuchroo & Fox (1982) é o mais usado e corresponde a um rendimento de extração de 70% do azoto solúvel; podem ser alcançados rendimentos mais elevados por repetição do procedimento no precipitado respetivo (Rank, 1985).

De um modo geral, faz-se primeiro a extração em água, pelo que posteriormente se procede ao fracionamento do extrato aquoso por recurso a solventes com um maior carácter ácido (precipitantes de proteínas), como o ácido tricloroacético e o ácido fosfotúngstico, para maior seleção de péptidos e aminoácidos (Rank, 1985; Upadhyay *et al.*, 2004).

Outros procedimentos de extração primária incluem a extração em clorofórmio/metanol, que visa seleccionar também os péptidos hidrossolúveis mais hidrófobos do queijo, e a extração em 5% de cloreto de sódio que pode extrair mais compostos azotados do que as duas extrações supra referidas (Rank, 1985).

1.3.4.1.2 Fracionamento da Fração Solúvel em Água

1.3.4.1.2.1 Fração Solúvel a pH 4,6

Um dos procedimentos de combinação extração-fracionamento mais comuns é a homogeneização de queijo ralado em tampão de acetato de sódio pH 4,6. Tipicamente, este procedimento de extração é utilizado para isolar péptidos médios e curtos. Contudo, outros componentes no queijo, como proteínas do soro e aminoácidos, são solúveis neste tampão (Rank, 1985). De notar que caseínas γ precipitam a pH 4,6 (Rank, 1985). Foi verificado que 95% dos compostos azotados presentes no primeiro extrato aquoso do queijo permaneciam solúveis quando acidificados a pH 4,6 com HCl (Rank, 1985).

1.3.4.1.2.2 Fracionamento com 2 a 12% de Ácido Tricloroacético

A precipitação de diversos compostos azotados em solução por ácido tricloroacético (TCA) tem sido um método clássico. Foi demonstrado que 2% TCA removia fundamentalmente péptidos longos mas 12% TCA removia alguns péptidos longos, alguns péptidos curtos e aminoácidos. A concentração de azoto solúvel em 12% TCA aumenta ao longo da maturação, o que demonstra que a fração solúvel em TCA contém os péptidos produzidos pelas enzimas do coagulante, assim como pela flora microbiana presente (Rank, 1985). Esta fração corresponde ao azoto não proteico (Alvarenga, 2008).

Poder-se-á optar pelo fracionamento em 70% etanol, que é análoga à fração 12% TCA, apesar de o etanol precipitar mais proteína a partir do extrato aquoso (Rank, 1985).

1.3.4.1.2.3 Fracionamento com 5% Ácido Fosfotúngstico

O fracionamento com 5% ácido fosfotúngstico (PTA) é o método mais seletivo, constituindo esta fração apenas aminoácidos e péptidos com um peso molecular não superior a 600 Da (Rank, 1985). Esta fração corresponde ao azoto aminoacídico uma vez que o azoto solúvel neste precipitante é uma medida do conjunto de aminoácidos, os quais podem ser quantificados e identificados (McSweeney & Fox, 1997). Foi reportado que apenas 1,5 e 3% do azoto total em queijos com 1 e 3 meses de cura eram solúveis nesta fração (Rank, 1985).

As duas últimas frações supra mencionadas representam a extensão da proteólise secundária ou o grau de profundidade da proteólise, ou seja, até que ponto as proteínas e os péptidos estão a ser degradados em péptidos médios e curtos e aminoácidos livres, indicando se o processo de maturação foi conseguido totalmente ou não. Deste modo, estas frações são boas indicadores de atividade das proteases e das peptidases microbianas, uma vez que os valores destas frações, no final da cura, não dependem do tipo de agente coagulante usado (Pintado *et al.*, 2008).

1.3.4.1.3 Formação de Grupos Reativos

Outras técnicas inespecíficas utilizadas para quantificar a proteólise baseiam-se na clivagem da ligação peptídica, a qual resulta na formação de grupo amino que pode reagir com diversos reagentes, como o ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico ou ninidrina ou α -ftaldeído, para a formação de cromóforos na deteção de aminoácidos livres totais por espectrofotometria (Upadhyay *et al.*, 2004).

1.3.4.1.4 Métodos Específicos: Eletroforese e RP-HPLC

Os métodos não-específicos dão uma ideia geral da proteólise, contudo não dão informação acerca dos péptidos específicos produzidos ou degradados durante a maturação. Técnicas específicas para separação de componentes solúveis, nomeadamente eletroforese e cromatografia, têm sido

ferramentas muito úteis para resolver, isolar e identificar os péptidos individuais e aminoácidos livres que são produzidos durante a maturação do queijo (Rank, 1985; Upadhyay *et al.*, 2004).

A eletroforese em gel de poliacrilamida, usando ureia como agente desnaturante (Ureia-PAGE), é uma ferramenta poderosa na monitorização da proteólise primária, definida como aquelas alterações nas caseínas α , β e γ , péptidos, e outras bandas menores, bem como para comparação dos padrões de hidrólise da caseína em queijos manufaturados com leite de diferentes espécies (Upadhyay *et al.*, 2004).

No que concerne a técnicas cromatográficas, a mais utilizada é cromatografia líquida de fase reversa de alta eficiência a RP-HPLC para caracterizar péptidos em hidrolisados de caseína, sendo esta técnica muito valiosa para resolver péptidos curtos em frações de queijo, quando hifenada à Espectrometria de Massa. Têm sido estudadas as frações azotadas WSN, pH 4,6 e extratos insolúveis (McSweeney & Fox, 1997).

Também, a eletroforese capilar (EC) é vista como uma técnica excelente para resolver caseínas e péptidos provenientes das mesmas, bem como proteínas do soro lácteo. O perfil de péptidos obtido por eletroforese capilar complementa a informação obtida por RP-HPLC (McSweeney & Fox, 1997).

1.4 Segurança Microbiológica

Os microrganismos patogénicos mais documentados presentes nos queijos, inclusive segundo dados epidemiológicos disponíveis, são: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7. A presença destas bactérias patogénicas em queijos fabricados com leite cru ou queijos industriais, de leite pasteurizado, que são recontaminados pós-pasteurização causam um grave perigo à saúde pública devido ao aumento do número de casos de surto e pela severidade dos seus sintomas (Kousta *et al.*, 2009). Contudo, os derivados lácteos, nomeadamente, o queijo, têm sido reportados como produtos notavelmente seguros, do ponto de vista sanitário. De notar que, de acordo com os dados disponíveis, nunca foi demonstrado que queijos feitos a partir de leite cru fossem menos seguros comparativamente aos que são feitos a partir de leite pasteurizado (Beuvier & Buchin, 2004).

A maior parte destes microrganismos capazes de se multiplicar e sobreviver nos queijos e que pelo seu consumo podem provocar intoxicações ou toxinfecções nos humanos, estão catalogados, havendo inclusive limites legais estabelecidos para a sua presença (Regulamento comunitário n.º 2073/2005 de 15 de novembro alterado pelo 1441/2007 de 5 de dezembro). No caso de se detetarem lotes com limites superiores aos determinados legalmente, estes deverão ser retirados do mercado (Tabelas 1.1 e 1.2).

Tabela 1.1: Critérios obrigatórios de segurança.

Microrganismo / Toxinas	Regulamento
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência em 25 g, n=5, c=0
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 1g, n=10, c=0
Enterotoxinas estafilocócicas	Não detetadas em 25g, n=5, c=0

Tabela 1.2: Critérios analíticos – germes indicadores de falta de higiene.

Microrganismo	Produto	Regulamento (por g)
Estafilococos coagulase positivos	Queijo com leite cru	n=5. m=10 000. M=100 000. c=2.
	Queijo com leite tratado termicamente e com leite pasteurizado	n=5. m=100. M=1000. c=2
	Queijos frescos	n=5. m=10. M=100. c=2

Tabela 1.2 (continuação): Critérios analíticos – germes indicadores de falta de higiene.

<i>Escherichia coli</i>	Queijo com leite tratado termicamente	n=5. m=100. M=1000. c=2
-------------------------	---------------------------------------	----------------------------------

Em que os parâmetros n , m , M e c são definidos do seguinte modo:

n : número de unidades que compõem a amostra;

m : valor limiar do número de bactérias; o resultado é considerado satisfatório se todas as unidades da amostra apresentarem um número de bactérias igual ou inferior a m ;

M : valor limite do número de bactérias; se uma ou várias unidades da amostra apresentarem um número de bactérias igual ou superior a M , o resultado é considerado não satisfatório;

c : número de unidades da amostra cujo número de bactérias se pode situar entre m e M , sendo a amostra considerada aceitável se as outras unidades apresentarem um número de bactérias igual ou inferior a m .

O crescimento de patogénicos nos queijos depende da variedade do queijo e da tecnologia utilizada no seu fabrico. Está comprovado que os patogénicos, como a maior parte dos microrganismos, se desenvolvem mais facilmente em queijos que possuem humidade e pH elevados e baixo teor em sal, do que em queijos feitos com massa cozida, de cura prolongada. A ocorrência de bactérias patogénicas tem sido relatada em alguns queijos de pasta mole (com humidade e pH elevados) feitos a partir de leite cru, em particular, *S. aureus*, apesar do risco de produção da sua enterotoxina, em queijos, ser muito baixo. De notar que a ocorrência de *L. monocytogenes* não é somente um problema de queijos feitos com leite cru. Aliás, este microrganismo apresenta maior incidência em queijos feitos a partir de leite pasteurizado, nos quais estão envolvidas pós-contaminações decorrentes do contacto com superfícies e equipamentos (Beuvier & Buchin, 2004).

É dado adquirido que *E. coli* e *Salmonella* spp. são eliminadas lentamente durante a maturação de queijos duros, sendo que para estes produtos é utilizado um tempo mínimo de cura como requisito do sistema de segurança alimentar baseado no método do HACCP. Aliás, a legislação americana impõe que todos os queijos importados que sejam fabricados a partir de leite cru tenham uma maturação mínima de 60 dias, para que os patogénicos *E. coli* e *Salmonella* sejam presumidos como ausentes antes do seu consumo (Beuvier & Buchin, 2004). A regulamentação europeia exige também um tempo de cura mínimo de 60 dias para queijo fabricado a partir de leite cru, com exceções abertas para as DOP registadas, para as quais existe, no entanto, um conjunto de exigências de garantia sanitária referentes aos efetivos produtores de leite ou às regiões de produção, no que se refere a zoonoses (Decreto-lei n.º 193/2004 de 17 de agosto; Portaria n.º 861/84 de 15 de novembro; Regulamento comunitário n.º 1662/2006 de 6 de novembro).

De referir que o leite cru ou leite mal pasteurizado ou derivados lácteos, como o queijo, têm sido implicados na transmissão de toxinfecções a humanos devido à presença de *Yersinia enterocolitica*, microrganismo psicrotrófico patogénico pertencente à família das *Enterobacteriaceae* (Yucel & Ulusoy, 2006). Um estudo realizado por Yucel & Ulusoy (2006) indicou que este microrganismo é isolado com maior probabilidade a partir de alimentos com elevados níveis de coliformes. Estes últimos são contaminantes muito frequentes em leites crus, sendo destruídos pela pasteurização. Contudo, aparecem facilmente nos queijos devido a pós-contaminações no decurso do processo de fabrico, indicando a falta de uma higiene pessoal adequada na manipulação e falhas na higiene das instalações e equipamentos, no caso da contaminação advir do processamento. Quando assim sucede, a recontaminação por coliformes pode provocar o inchamento opado e uma má estrutura da massa em queijos (Perry, 2004).

1.5 Salga do Queijo

A salga é um passo essencial na produção de queijo. O sal (NaCl) é utilizado como conservante alimentar no queijo por contribuir para o controlo do crescimento e atividade microbiana, mediante o decréscimo da atividade da água que conduz à minimização da esporulação e prevenção do desenvolvimento de patogénicos no alimento. Adicionalmente, influencia acentuadamente a velocidade e a intensidade da maturação através do controlo de diversas atividades enzimáticas no queijo, de efeitos específicos na sinérese dos grãos da coalhada e na redução concomitante dos níveis de humidade e nas alterações que imprime na estrutura da rede proteica, sendo que estas últimas influenciam a textura, a solubilidade proteica e provavelmente a sua conformação. A terceira característica fundamental do uso de cloreto de sódio é a sua contribuição direta no sabor, uma vez que ajuda a mascarar sabores indesejáveis de baixa intensidade. Contribui também para o início da formação da crosta do queijo. É prática comum, na indústria queijeira, adicionar o sal nos grãos da coalhada ou no queijo no momento em que este atinge uma acidificação adequada promovida pelos fermentos lácteos, ao invés da salga no leite, uma vez que a salga antes da adição do coalho compromete, em muito, a formação do coágulo e a sinérese da coalhada, por afetar a atividade

enzimática e a qualidade das ligações micelares responsáveis pela coagulação, e por inibição das bactérias do ácido láctico inicialmente adicionadas (Guinee & Fox, 2004).

No que concerne aos tipos de salga, existem quatro métodos. São eles: no leite, na massa, a seco e em salmoura. À exceção do primeiro método, temos como pré-requisito comum para a absorção de sal pelo queijo a existência de um gradiente de sal na fase aquosa entre o queijo e o meio da salga.

1.5.1 Tipos de Salga

NO LEITE: Este tipo de salga é utilizado parcialmente nos queijos Ricotta e Domiati, onde em geral não se ultrapassa c. 2% de sal sobre o volume de leite, para não comprometer a força do coalho, e na sua totalidade (15 a 25 g.L⁻¹ leite) no queijo de ovelha tradicional de Azeitão (DOP), no qual é usado o cardo como agente coagulante. Apresenta a vantagem da obtenção de uma boa distribuição de sal no queijo, porém, a perda de sal no soro é extremamente elevada. Como desvantagens, temos: o aumento do tempo de coagulação devido a uma inibição parcial das enzimas do coalho; o aumento da hidratação das proteínas, que retêm mais soro no queijo; uma maior fragilidade da coalhada; e o aumento do tempo de agitação e corte da massa, uma vez que a saída de soro da massa do queijo é dificultada (Guinee & Fox, 2004).

NA MASSA: Este tipo de salga é realizada antes do encinchamento por adição direta e mistura do sal seco razoavelmente distribuído nos grãos da coalhada por redução da sua dimensão, fator que se traduz no aumento da retenção do sal. A quantidade de sal adicionada varia em função do teor desejado no produto final, tendo em conta que em queijos mais húmidos existe perda de sal no decurso do esgotamento do soro. Este método é utilizado em queijos Cheddar, Cottage, etc. (Guinee & Fox, 2004); no caso particular do queijo de São João do Pico são adicionados c. 4 kg de sal para 1000 litros de leite trabalhado, obtendo-se, em média, 2,0% de sal expresso em cloretos, no produto final.

Quando a salga é distribuída sobre a superfície da coalhada ou grãos da coalhada, algum NaCl dissolve-se na água da superfície e difunde-se lentamente para o interior do grão a partir de muitas superfícies, em simultâneo. É gerado um movimento de difusão contracorrente do soro a sair do grão da coalhada para a superfície, o qual dissolve os cristais de sal restantes e, de facto, cria-se uma solução de salmoura sobressaturada à volta de cada partícula, fazendo com que a mistura da massa da coalhada com o sal seja apropriada (Guinee & Fox, 2004).

Neste tipo de salga, o tempo requerido para a absorção de uma quantidade adequada de sal na salga na massa (10-20 min) é menor, comparativamente à salga por imersão de queijos inteiros em salmoura (0,5 a 5 ou mais dias, dependendo das dimensões) (Guinee & Fox, 2004).

A SECO: É realizada por aplicação de cristais de sal à superfície de queijos enformados, tendo aplicação em queijos azuis. Neste caso, o queijo enformado pode ser visualizado como um bloco de coalhada, que por sua vez, pode ser visto como uma partícula muito grande, sendo que uma solução de sal seco na camada de humidade à superfície é um pré-requisito para a absorção de sal neste método. O movimento de difusão contracorrente de humidade, a partir do interior de queijo para exterior, cria uma camada de salmoura sobressaturada à superfície do queijo que provoca a migração do sal para o interior. Devido ao facto da superfície estar em contacto com uma salmoura concentrada durante um grande período de tempo (vários dias), há uma perda de humidade relativamente elevada da superfície e subsequentemente uma redução da mobilidade do sal para o interior do queijo, o que leva com que a velocidade de absorção de sal por este método seja menor do que a salga em salmoura, sendo que a consecução do equilíbrio de sal e humidade na fase aquosa de toda a massa do queijo após o momento da salga apresenta uma probabilidade quase nula de ser atingido, devido à existência de enormes gradientes de concentração entre diferentes regiões no queijo (adaptado de Guinee & Fox, 2004).

Este tipo de salga, em queijo desenformado, é muito habitual em queijos tradicionais portugueses, como por exemplo, o queijo Serra da Estrela DOP.

SALMOURA: A salmoura trata-se de uma solução salina de cloreto de sódio com uma composição típica de, por exemplo, 18-22% NaCl (m/m) e 0,5% CaCl_2 (m/m), sendo caracterizada por pH entre 5,2 e 5,3. Deste modo, os queijos ficam imersos na solução de salmoura até adquirirem a quantidade de sal necessária e um grau ótimo de dissolução da *para*-caseína (Guinee & Fox, 2004; Perry, 2004). Este tipo de salga é mais aplicado em queijos semiduros como Edam, Gouda, Provolone, Saint Paulin, entre outros (Guinee & Fox, 2004).

Uma vez o queijo colocado em salmoura dá-se a difusão das moléculas de NaCl, dissociada nos seus iões Na^+ e Cl^- , da salmoura para o queijo como consequência da diferença de pressão osmótica entre a humidade do queijo e a salmoura. O soro, conjuntamente com outras substâncias dissolvidas (lactose, lactato, fosfato de cálcio, proteínas, péptidos solúveis e minerais), difunde-se através da matriz do queijo para a salmoura de modo a restaurar o equilíbrio da pressão osmótica. Neste tipo de salga, o queijo perde água, resultando na perda de peso líquido do produto (Guinee & Fox, 2004). No início do processo, a superfície do queijo fica mais concentrada em sal que o seu interior, sendo que, posteriormente, o sal difunde-se lentamente pela matriz para a região do interior, menos concentrada neste soluto. Também, durante o processo da salga, ocorre um aumento da hidratação da caseína com NaCl que pode ser atribuído à ligação da caseína ao Na^+ , em substituição do cálcio ou fosfato de cálcio da *para*-caseína. De facto, a adição do NaCl parece gerar um efeito de permuta iónica sódio-cálcio com a *para*-caseína, que se traduz numa massa mais macia (Guinee & Fox, 2004; Perry, 2004). Este efeito é dependente do pH da salmoura. Assim, para pH inferior a 5,0, haverá um maior número de protões (H^+) ligados à molécula de *para*-caseína comparativamente a iões Ca^{2+} e, consequentemente haverá uma incorporação insuficiente de iões Na^+ , resultando em queijos duros e

de massa quebradiça. O inverso, em que o pH da salmoura é superior a 5,8, resulta em queijos extra macios devido à incorporação excessiva de iões Na^+ na molécula *para*-caseína relativamente a iões Ca^{2+} , os quais também se encontram em excesso (Perry, 2004).

À semelhança do método anterior, este tipo de salga apresenta a desvantagem de o equilíbrio de sal e humidade ser lento ou raramente atingido, devido ao enorme gradiente de sal na superfície para a região do interior centro do queijo (Guinee & Fox, 2004).

1.6 Funções do Sal nos Queijos

1.6.1 Aspetos Microbiológicos

Adicionalmente ao pH, a_w e teor em ácido láctico, o sal é um fator que garante a qualidade dos queijos tradicionais. O sal é o agente determinante principal da atividade da água num produto e, consequentemente exerce controlo sobre o crescimento microbiano, a atividade enzimática e alterações bioquímicas durante a etapa da cura. Neste contexto, o sal inativa os microrganismos não apenas por redução da atividade da água, mas também por perturbação na transferência de massa e libertação de proteases e peptidases para o meio extracelular através da lise das células microbianas, porquanto o sal aumenta a pressão osmótica na fase aquosa do alimento, provocando a desidratação da bactéria, que origina a sua destruição ou previne o seu crescimento e proliferação (Guinee & Fox, 2004).

No queijo, os solutos envolvidos são sais solúveis, lactato, péptidos de baixo peso molecular, aminoácidos livres e proteínas séricas (Guinee & Fox, 2004). Nos queijos frescos, a atividade da água é determinada pela elevada concentração de NaCl na fase aquosa. Por outro lado, em queijo curado, os péptidos de baixo peso molecular e aminoácidos livres são responsáveis por reduzir a atividade da água. Juntamente com o pH adequado, atividade da água e potencial redox, o sal tem mais influência na microbiologia dos queijos, inibindo o crescimento de patogénicos e controlando a população microbiana. Outra função importante do sal no queijo é o seu impacto na velocidade de fermentação da lactose (Cruz *et al.*, 2011).

1.6.2 Efeitos da Desestabilização da Caseína

As proteínas do queijo não interagem apenas entre si, mas também com a água, gordura e o sal. Sugere-se que a extensão de hidratação da proteína poderá influenciar a estrutura, a estabilidade físico-química e as propriedades físicas do queijo, o que pode comprometer diretamente a reologia e a textura do produto (Cruz *et al.*, 2011).

O sal, o pH e o teor de cálcio exercem influência direta na hidratação ou agregação da *para*-caseína, o que por sua vez, afeta a capacidade de hidratação da matriz do produto e a sua tendência para a sinérese (Guinee, 2004). Foi observado que a hidratação da caseína era influenciada pelo pH,

concentração de sódio e o uso de agente coagulante. Valores máximos de hidratação da caseína foram observados por Creamer (1985) a pH 5,2, sendo que quando o pH foi reduzido após a adição de agente coagulante, não foi observado um decréscimo na hidratação da caseína. Tal facto é possível devido à substituição do cálcio ou fosfato de cálcio por sódio na micela da caseína, com o aumento simultâneo no número de grupos iónicos e matriz do produto. A adição de cloreto de sódio altera o comportamento da caseína, diminuindo o pH, o que sugere a interação do sódio com a caseína, resultando na libertação de protões (Creamer, 1985).

A redução na concentração de sal decresce, significativamente, a solubilidade das proteínas, devido à alteração da força iónica no ambiente da matriz (Cruz *et al.*, 2011).

1.6.3 Regulação da Atividade Enzimática

O sal influencia a velocidade da proteólise no queijo por modificação do estado de agregação das moléculas-substrato, afetando e controlando o crescimento dos fermentos lácteos e microflora secundária e afetando diretamente a atividade das enzimas envolvidas (Katsiari *et al.*, 2000).

1.6.3.1 Enzimas do Coagulante

A quimosina, uma protease aspártica de origem gástrica, é a principal protease do coalho animal tradicional de vitelo usada em queijaria para coagular o leite. O principal papel da quimosina na produção de queijo é a clivagem da ligação fenilalanina (105)-meteonina (106) da micela estabilizadora da caseína, a caseína *k*, tendo como resultado a destruição da estabilidade coloidal das micelas, conduzindo à formação de gel (gelificação) a temperaturas superiores a 20°C (Fox, 1989; Upadhyay *et al.*, 2004). A maioria do coalho adicionado ao leite é removido no esgotamento do soro, contudo, alguma é retida nos grãos da coalhada e desempenha um papel fundamental na proteólise inicial das caseínas em muitas variedades de queijo (Upadhyay *et al.*, 2004). Concentrações elevadas de NaCl inibem a hidrólise da caseína *k* (Fox, 1989).

Em todas as variedades de queijos feitos com coalho como agente coagulante, a caseína α_{s1} é o substrato principal para a proteólise. A primeira ligação na caseína α_{s1} clivada pela quimosina é Phe (23)-Phe (24) ou Phe (24)-Val (25). Julga-se que a clivagem desta ligação é responsável para o amaciamento inicial da pasta do queijo durante os primeiros estadios de maturação, sendo que o péptido curto α_{s1} -I (α_{s1} -CN f24/25-199) é hidrolisado rapidamente pelas proteases dos fermentos lácteos (Grappin, 1985; Fox, 1989; Upadhyay *et al.*, 2004).

A hidrólise da caseína α_{s1} por enzimas do coagulante é muito influenciada pela concentração de NaCl, sendo a decomposição retardada a níveis muito baixos de sal. A atividade proteolítica da quimosina é estimulada por aumento das concentrações de NaCl até cerca de 6% (m/m) e inibida a níveis mais elevados, mas a proteólise, apesar de condicionada, ocorre até 20% NaCl (m/m) (Guinee

& Fox, 2004). O efeito da concentração de sal foi demonstrado pela estabilização de um gradiente de sal no queijo Cheddar. Após 1 mês de cura a 10°C, a caseína α_{s1} foi quase totalmente degradada a 4% de sal na fase aquosa, enquanto 40% de caseína α_{s1} foi hidrolisada a 8% de sal na fase aquosa. A relação entre teor de sal na fase aquosa e a proteólise foi linear entre estes dois extremos (Grappin, 1985).

A caseína α_{s2} é resistente à proteólise pela quimosina e apesar da *para*-caseína *k* apresentar diversas posições disponíveis para hidrólise, esta não é hidrolisada durante a maturação, ficando retida nos grãos da coalhada (Grappin, 1985; Upadhyay *et al.*, 2004).

A ação proteolítica da quimosina sob a caseína β é muito reduzida. O NaCl inibe a hidrólise da caseína β , fortemente a 5% NaCl e completamente a 10% NaCl (Fox, 1989; Upadhyay *et al.*, 2004). O efeito inibitório do sal na proteólise da caseína β no queijo Cheddar parece ser particularmente importante para redução do sabor amargo, cuja ocorrência é significativamente aumentada em baixas concentrações de sal (4,9%) (Cruz *et al.*, 2011). Sais como o cloreto de potássio, KCl, e cloreto de cálcio, CaCl_2 , são tão eficazes como o NaCl na inibição da proteólise da caseína β (Guinee & Fox, 2004).

1.6.3.2 Plasmina

O leite contém um número de proteases endógenas, das quais a plasmina é considerada a mais importante no que concerne à maturação de queijos, nomeadamente em queijos de pasta filante e de massa cozida e em queijos em que o pH aumenta ao longo da cura. É uma enzima termoestável, apresentando um pH e uma temperatura ótimos de ~7,5 e 37°C, respetivamente. A caseína β possui 15-17 ligações potencialmente suscetíveis à plasmina, contudo, apenas três são hidrolisadas, Lys (28)-Lys (29), Lys (105)-His (106) e Lys (107)-Glu (108), produzindo as caseínas γ_1 (29-209), γ_2 (106-209) e γ_3 (108-208) e frações designadas por proteose peptonas (Upadhyay *et al.*, 2004). Esta protease alcalina do leite continua ativa na presença de elevados níveis de sal (8%), desde que o pH seja suficientemente alto (p.ex., 6,3), o que sugere que a influência do pH na atividade da plasmina tem maior relevância comparativamente aos níveis de sal que poderão estar presentes no queijo (Grappin, 1985).

A caseína α_{s2} também é um bom substrato para a plasmina. Porém, os péptidos resultantes, apesar de prováveis pelo decréscimo do teor da caseína α_{s2} ao longo da maturação, ainda não foram identificados em produtos lácteos (Upadhyay *et al.*, 2004). De referir que a degradação da caseína α_{s2} em queijos Cheddar e Suíço foi relacionada com o teor de plasmina no queijo (Grappin, 1985).

A caseína α_{s1} é menos suscetível a hidrólise pela plasmina comparativamente à caseína β , podendo a caseína λ ser um dos produtos (Fox, 1989; Upadhyay *et al.*, 2004). A caseína k é resistente à ação proteolítica da plasmina (Upadhyay *et al.*, 2004).

1.6.3.3 Flora microbiana

Apesar das principais componentes do sistema proteolítico das bactérias lácticas que compõem os fermentos serem proteases, responsáveis pela degradação das caseínas em oligopéptidos, as peptidases catalisam a hidrólise de péptidos a aminoácidos. Enquanto que o papel de algumas peptidases, nomeadamente as endopeptidases, é a degradação de oligopéptidos, produzidos anteriormente pela ação da quimosina na caseína α_{s1} ou pela ação da plasmina na caseína β a péptidos curtos, a função das exopeptidases é libertar um ou dois aminoácidos de cada vez dos péptidos curtos, uma vez que clivam na extremidade N-terminal (Fox, 1989; Upadhyay *et al.*, 2004).

Em muitas variedades de queijo, é adicionada deliberadamente ou incentivado o crescimento de flora microbiana secundária. A título de exemplo, têm sido adicionadas estirpes de *Lactobacillus* a Cheddar com o objectivo de melhorar o sabor e acelerar a maturação. Estas bactérias possuem sistemas proteolíticos (proteases e peptidases) similares aos de outras bactérias lácticas. *Brevibacterium linens* segrega uma protease extracelular e uma aminopeptidase, e possui um número de peptidases intracelulares que contribuem para a proteólise de queijos curados com auxílio de flora microbiana superficial. *Penicillium roqueforti* e *Penicillium caseicolum* produzem proteases aspárticas e metaloproteases ácidas e neutras e diversas peptidases, as quais contribuem para a extensão da proteólise em queijos azuis (Grappin, 1985; Fox, 1989; Upadhyay *et al.*, 2004). *P. camembert* segrega proteases aspárticas e metaloproteases que contribuem para a proteólise dos queijos Camembert e Brie. A protease de aspartilo de *P. camemberti* hidrolisa a caseína α_{s1} mais rapidamente do que as caseínas β ou k . As proteases ácidas de *P. camemberti* e *P. roqueforti* tem ação similar na caseína β e hidrolisam as ligações Lys (97)-Val (98), Lys (99)-Glu (100) e Lys (29)-Ile (30) a uma velocidade superior relativamente a outras ligações na caseína β (Upadhyay *et al.*, 2004).

Como já foi referido (1.6.1), o sal afeta e controla o crescimento dos fermentos lácticos e flora microbiana secundária, afetando diretamente a atividade das enzimas envolvidas (Katsiari *et al.*, 2000).

1.6.4 Efeitos nas Propriedades Físicas do Queijo

O NaCl exerce uma influência significativa nas propriedades físicas do queijo, nomeadamente na sua reologia e textura. Isto pode ser facilmente observado por comparação com as características sensoriais no queijo isento de sal com o queijo controlo. O queijo salgado apresenta uma textura mais firme, enquanto o queijo isento de sal possui uma consistência mais amolecida e cremosa. Em

contrapartida, elevadas concentrações de sal resultam num queijo mais duro e quebradiço, tendo este fenómeno sido observado nos queijos como “Gaziantep”, “Domiat” e “Feta” (Guinee & Fox, 2004). Euston *et al.* (2002) demonstraram um efeito interativo entre os níveis de sal e o pH na microestrutura e reologia de queijo magro. Quando foi aumentado o teor de NaCl de 1,5 para 3,5% a pH 4,6, verificou-se um incremento no grau de dilatação da rede proteica (indicando um aumento nos níveis de hidratação), que reduziu a elasticidade do queijo, tornando-o mais quebradiço. Foi também observada a influência do sal nas propriedades físicas de queijo tipo “Munster”. Este queijo é originalmente isento de sal e foi submetido a injeções de salmoura (20% de sódio) até concentrações de 2,7%. Verificou-se em concentrações de sal não superiores a 0,5% um aumento na dureza e na viscosidade. Em concentrações de sal superiores a 0,5%, ocorreu um aumento adicional na dureza e um decréscimo na adesividade, pese embora não terem existido alterações nas características de fusão. Adicionalmente, o aumento do teor de sal não provocou permutas entre iões cálcio-sódio, o que manteve a solubilidade de cálcio constante (Cruz *et al.*, 2011).

A textura do queijo é um atributo fundamental na sua qualidade, podendo ser determinante na sua aceitabilidade pelo consumidor (O’Callaghan & Guinee, 2004); no caso dos queijos trata-se mesmo de uma propriedade muito importante na identidade do produto (Alvarenga, 2008). É influenciada por fatores que determinam a estrutura, como o procedimento de fabrico, a composição do leite, os níveis de humidade, o sal, o pH e a taxa de proteólise durante a maturação, sendo esta última o fenómeno bioquímico mais complexo, responsável pelo desenvolvimento do sabor e da textura (O’Callaghan & Guinee, 2004; Alvarenga, 2008). As transformações texturais do queijo durante a maturação podem ser opostas entre si, podendo resultar no amaciamento e amolecimento da pasta devido ao predomínio da hidrólise da caseína α_{s1} a péptido α_{s1} -I, ou no seu endurecimento no caso do processo de desidratação prevalecer (Fox, 1989; Alvarenga, 2008). Porém, está estabelecido que o amolecimento da pasta, induzida pela proteólise, predomina quando o queijo é fabricado com leite cru (Alvarenga, 2008).

Muitos métodos instrumentais têm sido desenvolvidos para determinar as propriedades de textura dos alimentos, merecendo principal destaque a Análise de Perfil de Textura (TPA) em penetração por ser uma técnica adequada como método rápido para a medição de textura no teste em queijos de pasta mole. Este tipo de teste envolve a medição da força necessária relativa à inserção de uma sonda, cone ou cilíndrica, que atua duas vezes no material em penetração, com um tempo de espera entre as duas ações para recuperação do material. O texturograma obtido corresponde a uma curva de força *versus* tempo, a partir do qual são determinados os parâmetros indicadores do comportamento mecânico: dureza, adesividade e coesividade. Poder-se-á estudar correlações entre alguns parâmetros de textura com aceitação sensorial, bem como com os índices de proteólise (O’Callaghan & Guinee, 2004; Alvarenga, 2008; Souza, 2011).

Num estudo realizado por Ayyash *et al.* (2011) relativo à redução dos níveis de sal por substituição com cloreto de potássio, em proporções graduais, no queijo Halloumi foi verificado que os parâmetros

de dureza, adesividade e coesividade das diversas tipologias experimentais mantiveram-se semelhantes ao queijo controlo, durante a maturação. Ao longo do amadurecimento a dureza e a coesividade decresceram, enquanto a adesividade aumentou.

1.7 Queijos com Teor Reduzido em Sódio: Implicações na Tecnologia e Implicações Sensoriais

Pese embora a influência do sal nas características do queijo, as quais incluem a proteólise, a lipólise, as propriedades de textura, e sabor/aroma, o sal é tradicionalmente utilizado como conservante, provocando sérios problemas de saúde ao consumidor quando adicionado em excesso (Ayyash *et al.*, 2011). Com um aumento no consumo e uso mais frequente de queijos em pratos culinários, adicionalmente ao uso tradicional do queijo de mesa, é interessante desenvolver tecnologias para a produção de queijo de baixos teores em sódio, com o objetivo de atender a necessidades de alguns segmentos populacionais. De facto, o desenvolvimento de queijo com baixo teor em sódio representa uma contribuição para a indústria láctea, para além de ser uma opção tecnológica de valor acrescentado (Drake *et al.*, 2011; Liem *et al.*, 2011).

De acordo com a legislação americana e canadense, o queijo para ser considerado como um produto de teor baixo em sódio, não deve conter mais que 140 mg de sódio por porção de 50 g em queijo fresco, 30 g em queijo de pasta mole e de 21 g em queijo duro (Cruz *et al.*, 2011; Katsiari *et al.*, 1997, 1998), ou seja, deve conter até 0,7% de sal (Cruz *et al.*, 2011). O teor de sal do produto normalmente presente em queijos fundidos varia de 325 a 798 mg por 50 g de queijo. Contudo, queijos fundidos com teor reduzido em sódio podem conter desde 244 a 600 mg por 50 g de queijo (FDA, 2008). Todavia, a legislação da União Europeia não contempla a suscetibilidade de cada tipo de alimento face à substância alvo, sódio/sal, alegando que para qualquer género alimentício seja considerado de baixo teor em sódio, este deverá conter uma quantidade não superior a 120 mg de sódio por 100 g ou 100 mL, com exceção da água, conforme disposto na retificação ao regulamento comunitário n.º 1924/2006 de 20 de dezembro, publicada em 2007.

Estudos sugerem que muitos fatores desempenham um papel na perceção do sabor salgado, incluindo a gordura, viscosidade, especiarias e a microestrutura do alimento (Drake *et al.*, 2011). Alguns autores demonstraram que o teor em água influencia a libertação de sódio e que o teor em matéria gorda influencia a perceção do salgado no decurso da mastigação, tendo sido sugerido que um aumento na água e uma diminuição no teor de matéria gorda pode ser uma via para reduzir a concentração de sódio sem alteração na perceção do sabor salgado. Contudo, e uma vez que a consistência e textura do queijo, bem como a mastigação e a salivação, influenciam a perceção do sabor salgado, alguns autores aconselham que deve ser encontrado um equilíbrio entre a composição e a estrutura para produzir queijos aceitáveis. Por outro lado, variações no teor de sódio e interações sensoriais têm um maior efeito nos produtos com baixo teor de gordura do que aqueles com elevado teor em matéria gorda (Agarwal *et al.*, 2011).

As principais intervenções tecnológicas que são aplicadas na redução do teor em sódio nos alimentos são o decréscimo da quantidade do NaCl adicionado, a substituição total ou parcial do NaCl com outros sais como o KCl, CaCl_2 ou MgCl_2 ou a adição de intensificadores de sabores como o glutamato monossódico (Guinee & Fox, 2004).

1.7.1 Processamento com Redução de NaCl

A primeira intervenção tecnológica que necessita de ser considerada é tipicamente reduzir a quantidade de NaCl adicionada (Guinee & Fox, 2004). Um grupo de especialistas do Reino Unido sugere que a redução na quantidade de sal entre 10 e 25% não é perceptível pelo consumidor (Cruz *et al.*, 2011).

Lindsay *et al.* (1982) demonstraram que a redução de sal na fase aquosa de 4,9 para 3,5% em queijo Cheddar não afetou significativamente as características organolépticas e a textura do produto, pese embora alguns consumidores preferiram o sabor salgado dos queijos com maiores teores de sal relativamente àqueles com baixos níveis de sódio, sendo que a modalidade de ensaio isenta de sal foi extremamente depreciada pelo painel de provadores. Outros estudos realizados neste queijo reportaram diferenças não detetáveis em concentrações reduzidas de sal de 4,1% a 3,1% (Schroeder *et al.*, 1988); contudo, quando os níveis de NaCl foram reduzidos a 0,7%, os queijos tornaram-se excessivamente viscosos, ácidos, azedos e com sabor e aroma residuais desagradáveis, indicando um aumento na proteólise (Schroeder *et al.*, 1988). Adicionalmente, Karahadian & Lindsay (1984) já teriam reportado que a modalidade deste queijo totalmente isenta de sal tinha revelado características sensoriais indesejáveis quando comparada com os respetivos queijos de níveis intermédios e convencionais de sal. Para além do mais e de acordo com Mistry & Kasperson (1998), queijos Cheddar com concentração mais alta de sal exibiram níveis mais baixos de proteólise e consistência mais dura e quebradiça. Em um estudo mais recente realizado por Rulikowska *et al.* (2013) onde foram produzidos queijos Cheddar com uma gama de concentrações de sal a variar de 0,5 a 3% (m/m), foi constatado que a redução simples de sal teve impactes negativos tanto no sabor, com o aumento do amargor, como na textura, com o decréscimo na firmeza. De um modo geral, foi verificado pela maioria destes autores no estudo da redução isolada de sal em queijo Cheddar que níveis mais elevados de proteólise eram obtidos com o decréscimo gradual de sal, em especial na versão isenta de sal (Mistry & Kasperson, 1998; Rulikowska *et al.*, 2013; Schroeder *et al.*, 1988).

Outros tipos de queijos também foram estudados relativamente a esta tipologia de salga, tal como o queijo Cottage, um tipo de queijo fresco, no qual foi observado por Wyatt (1983) que uma redução de 35% na quantidade de NaCl (de 1 a 0,65%) não influenciou a avaliação pelos consumidores, apesar da redução de 50% ter resultado numa baixa aceitação relativamente ao queijo controlo. Adicionalmente, a produção de queijo tipo Feta com baixo teor em sódio resultou em diferenças significativas na proteólise secundária, a qual foi maior em queijos com menores concentrações de NaCl comparativamente ao queijo padrão, e no sabor, no qual foi detetado um aumento no sabor

amargo com a redução da concentração de sódio (Aly, 1995); ainda assim, não foram detetadas diferenças significativas nos atributos de textura e pasta (Aly, 1995). Por analogia, um estudo realizado em queijo irlandês, no qual se fez variar o nível de sal entre 0,5 e 3%, ter-se-á observado que ambos os queijos com teores reduzidos em sal exibiram baixos níveis de desenvolvimento de sabor e aroma característicos deste queijo, tendo-se notado elevados níveis de sabor amargo (Cruz *et al.*, 2011). Pelo contrário, a produção do queijo tipo Edam com baixa quantidade de sódio (concentração de sódio entre 0,4 e 0,5%) resultou num produto com qualidade satisfatória (Cruz *et al.*, 2011).

1.7.2 Processamento com Substituição de NaCl

A substituição parcial de NaCl por KCl ajuda a resolver os problemas relativos à diminuição do teor em sódio por via da diminuição do sal utilizado. O cloreto de potássio tem sido o substituto que tem revelado um maior índice de sucesso, sendo o mais utilizado na substituição parcial do cloreto de sódio no queijo (Katsiari *et al.*, 2000). Um excesso de ingestão de KCl na dieta não apresenta nenhum efeito indesejável nas pessoas com hipertensão induzida pelo Na (Ayyash *et al.*, 2011; Drake *et al.*, 2011).

Em meados da década de 80, diversos estudos avaliaram a substituição do cloreto de sódio por outros sais devido à correlação elevada entre a ingestão de sal (NaCl) e a hipertensão. O sal de interesse foi o cloreto de potássio visto que estudos indicaram que um aumento da ingestão de potássio via dieta pode exercer um efeito protetor em indivíduos com hipertensão induzida pelo sódio, e sugeriram que produtos como o queijo podem ter uma substituição de NaCl por outros sais, até 50%, sem alterações significativas no sabor (Drake *et al.*, 2011). Contudo, existe uma controvérsia considerável no que respeita à aceitação, por parte do consumidor, destes produtos (Drake *et al.*, 2011), pois apesar do KCl contribuir para manter o sabor salgado e poder reduzir a quantidade nos alimentos até 25% sem perda na palatabilidade, este sal atribuiu um sabor azedo/metálico que os consumidores poderão considerar indesejável.

De acordo com alguns autores (Guinee & Fox, 2004, Johnson *et al.*, 2009), a alternativa de substituição do NaCl por KCl deve ser cuidadosamente estudada visto que em concentrações elevadas de KCl (>1%) tende a causar uma percepção de azedo considerável, para além de aumentar a proteólise, a atividade da água, a acidez e a dureza. Diversos estudos demonstraram que era possível substituir NaCl por KCl durante o processamento, sem afetar as propriedades sensoriais, reológicas, bem como a estabilidade do produto final. No entanto, os estudos relativos à substituição de NaCl por KCl em queijo devem seguir o desenvolvimento das características de modo a minimizar o impacto nas propriedades reológicas e sensoriais do produto, o que implica o estudo de parâmetros de qualidade, tais como proteólise e lipólise, juntamente com o tempo de prateleira (Cruz *et al.*, 2011).

Demott *et al.* (1984) reportaram que amostras de queijo Cottage com substituição total do NaCl por KCl ou a substituição parcial (50%) têm níveis de aceitação semelhantes entre eles e quando comparado com o queijo padrão.

Embora a maioria dos resultados demonstrem que a substituição do NaCl por misturas NaCl:KCl (1:1) normalmente não provoca alterações bioquímicas, texturais e microbiológicas, alguns estudos indicam que o uso de misturas com essa proporção afeta a qualidade sensorial do queijo. Assim sendo, as proporções 70:30 ou 60:40 (NaCl:KCl), tendem a ser mais atrativas, uma vez que reduzem o teor em sódio satisfatoriamente e mantêm o sabor e o aroma dos queijos (Cruz *et al.*, 2011).

Não deve ser esquecida a diversidade de tipos de queijo, relativamente à qual existe grande variabilidade quanto às origens das características específicas, existindo queijos onde grande parte dos riscos não existe de forma tão evidente, pois algumas das reações normalmente importantes não estão presentes ou têm escassa extensão. Assim, estudos relativos à substituição parcial ou total do NaCl por KCl podem divergir entre variedades de queijos. Alguns indicaram que a substituição total do NaCl por KCl aumentou a velocidade de proteólise no queijo Cheddar e que a redução de NaCl em queijo de tipo Appenzell por substituição parcial do KCl intensificou a decomposição da proteína do queijo. Porém, outros estudos não detetaram diferenças significativas na proteólise num determinado tempo de amostragem entre queijos de tipo Feta e Fynbo com NaCl ou misturas NaCl:KCl (Katsiari *et al.*, 2000).

Katsiari *et al.* (1997) relataram a viabilidade de reduzir até 50% o teor de sódio no queijo tradicional Feta usando misturas de NaCl e KCl (3:1 ou 1:1, m/m) no processo de salga, sem afetar negativamente a sua qualidade. Os resultados também indicaram que os queijos feitos com misturas de NaCl/KCl não exibiam diferenças significativas no que concerne à composição (humidade, gordura, proteína e sal), às propriedades físico-químicas (pH, a_w), sensoriais (aparência, consistência e textura, sabor/aroma, qualidade global) e texturais (fraturabilidade, dureza) comparativamente ao queijo controlo. O uso da mistura de NaCl/KCl 1:1 na salga de queijos Feta trouxe efetivamente o rácio de Na/K para próximo de 1,0, reduzindo também o teor em sódio em 50%. Numa extensão desse trabalho, Katsiari *et al.* (2000) estudaram a proteólise secundária em queijo Feta com diferentes teores em sódio produzidos a partir de leite de ovelha, por salga direta na massa e por imersão em salmoura; em ambos os casos, os queijos foram salgados com NaCl (controlo) e misturas de NaCl/KCl (3:1 ou 1:1, % m/m), de modo a estudar a influência da substituição parcial do NaCl por KCl na proteólise durante a maturação do queijo. Os resultados revelaram que a proteólise foi semelhante tanto no queijo controlo, como nos queijos experimentais, em todas as amostragens realizadas ao longo de todos os estágios de maturação, indicando que a substituição parcial do NaCl por KCl no fabrico do queijo Feta não teve efeito significativo na extensão e nas características da proteólise durante a maturação.

Katsiari *et al.* (2001) estudaram a proteólise em queijos Kefalograviera produzidos com teores baixos em sódio salgados com misturas de NaCl/KCl (3:1 ou 1:1, m/m), tendo como comparação o queijo convencional. A extensão e as características da proteólise secundária nos queijos foram monitorizadas durante a maturação por determinação Kjeldahl das frações azotadas (azoto solúvel em água, WSN; azoto solúvel em ácido tricloroacético, TCASN; azoto solúvel em ácido fosfotúngstico, PTASN), a determinação dos aminoácidos livres totais foi feita pelo método cádmio-ninidrina, a hidrólise das caseínas foi estudada por focagem isoeletrica, os péptidos de cadeia curta foram analisados por HPLC de fase reversa e os aminoácidos por HPLC de permuta iónica. Os resultados demonstraram que a proteólise dos queijos experimentais foi muito semelhante à do queijo controlo, em todas as fases da cura, indicando que a substituição parcial do NaCl por KCl na manufatura do queijo Kefalograviera não aumentou significativamente a extensão e as características da proteólise.

A redução em 55% de sódio na massa do queijo de tipo Caciotta com substituição parcial por KCl não revelou diferenças significativas no que respeita ao sabor/aroma e textura quando comparado com o queijo convencional (Quattrucci *et al.*, 1997).

Reps *et al.* (2009) avaliaram a possibilidade de incorporar mais potássio em queijos fundidos, e demonstraram que a produção desses tipos de queijos de boa qualidade era exequível com a adição de KCl com o uso simultâneo de agentes redutores de viscosidade, ou aumentando a concentração de sais de potássio ou de sal de dieta contendo KCl. Neste estudo, obteve-se um produto com um rácio Na/K muito semelhante ao recomendado e o sabor, aroma e textura foram considerados aceitáveis. Adicionalmente, os resultados da análise sensorial mostraram um aumento na aceitação associado à adição de KCl.

Ayyash e Shah (2010) investigaram o efeito da substituição parcial do NaCl por KCl na composição química, na contagem de bactérias lácticas, e no perfil de ácidos orgânicos no queijo Halloumi. Os queijos Halloumi foram produzidos com quatro soluções diferentes de salmoura a 18% incluindo NaCl apenas, 3NaCl:1KCl, 1NaCl:1KCl e 1NaCl:3KCl. Não foi observado nenhum efeito significativo entre o queijo controlo e os queijos experimentais em termos de humidade, gordura, proteína, contagem de bactérias lácticas, e valores de pH no mesmo período de armazenamento. Os teores de cinzas, sódio e potássio aumentaram significativamente durante o armazenamento nos queijos com o mesmo tratamento de salga, tendo sido observadas uma correlação positiva entre o teor de cinzas, Na e K, e uma correlação inversa entre ácidos orgânicos e os teores de Na e K. Numa extensão desse trabalho, Ayyash *et al.* (2011) estudaram a textura e a microestrutura dos queijos Halloumi, não tendo verificado diferenças significativas na dureza, coesividade, adesividade, e gomosidade entre os queijos ao longo da cura, apesar das propriedades de dureza, adesividade e gomosidade diminuírem ao longo da maturação, enquanto a adesividade aumentou; a textura de todos os queijos manteve-se compacta e fechada no decurso da maturação. Ter-se-á também verificado que o Ca apresentou uma correlação positiva com a dureza, coesividade e gomosidade, e uma correlação negativa com a adesividade demonstrada pelos tratamentos com as misturas de NaCl e KCl, o que suporta a

observação que o decréscimo na dureza pode ser atribuído à redução do teor em Ca, desempenhando, este mineral, um papel preponderante na textura. Em contrapartida, a dureza, coesividade e gomosidade correlacionaram-se negativamente com K e Na, e a adesividade demonstrou uma correlação positiva com K e Na. A correlação negativa do Na e K *versus* a correlação positiva de Ca com a dureza, coesividade, e gomosidade poder-se-á dever à permuta iónica Na ou K-Ca com a *para*-caseína. Neste estudo, admitiu-se que a permuta iónica entre Ca e Na ou K poderá ter ocorrido; as correlações destes elementos com os parâmetros do perfil de textura foram contraditórias. Com este estudo foi possível concluir a possibilidade de substituição do NaCl por KCl até 75% no queijo Halloumi, uma vez que o cloreto de potássio poderá desempenhar o mesmo papel do cloreto de sódio.

Ao contrário do efeito das misturas de NaCl e KCl resultarem numa qualidade global positiva, a substituição total do NaCl por KCl está associada com a produção de queijo extremamente ácido e com alterações na textura, o qual pode provocar o aumento da concentração de ácidos gordos livres e da proteólise (Cruz *et al.*, 2011).

Um aspeto que valerá a pena considerar serão as tipologias de fabrico associadas a estes queijos, quase todos eles tradicionais, submetidos aos efeitos de redução/substituição de NaCl (Tabela 1.3). Como se pode verificar pela revisão bibliográfica, os queijos estudados apresentam especificidades e tecnologias diferentes relativamente ao queijo São João do Pico considerado no presente estudo, e por conseguinte a influência das etapas determinantes do processo de fabrico poderão resultar em diferenças no produto final. Por conseguinte, é de crucial importância investigar os efeitos da redução de sal nos parâmetros de qualidade ao longo da maturação, nomeadamente, composição química e evolução da proteólise, conjuntamente com a segurança alimentar do queijo em estudo de modo a minimizar os impactes nas propriedades de textura e sensoriais do mesmo.

Tabela 1.3: Alguns parâmetros caracterizadores da tecnologia de fabrico dos diversos queijos estudados (Sá & Barbosa, 1990; Fox *et al.*, 2004).

Queijo	Leite	Coagulante	Coagulação	Dessoramento	Prensagem Final	Salga	Cura		
							Tempo mínimo	Temperatura	Humidade relativa
Appenzel	Cru, de vaca inteiro	Coalho	Cocção 45-48°C 15-20 min.	Lento, com escaldamento a 54-56°C.	Mecânica	Em salmoura	6 meses	16-20°C	80%
Caciota	De vaca pasteurizado parcialmente desnatado	Coalho	29 – 32°C 30-40 min.	Lento, com cocção a 41°C	Mecânica	A seco ou em salmoura	Consumido fresco ou no prazo máximo de 2 semanas a 6-8°C.		
Cheddar	De vaca pasteurizado parcialmente desnatado	Coalho	28 – 33°C 30-40 min.	Escaldamento até 39°C. Lento, com trabalho manual e mecânico	Mecânica	Na massa da coalhada	2 meses	8-12°C	85-90%
Cottage	De vaca pasteurizado parcial ou totalmente desnatado	Coalho ou coagulação pelo ácido	32°C; 4-6h	Lento, com agitação e cocção até 38°C e depois até 55°C.	-	Nos grãos da coalhada	Cons umido fresco		
Edam	De vaca pasteurizado parcialmente desnatado	Coalho	29-30°C; 30 min	Agitação e lavagem da massa	Mecânica	A seco no queijo e em salmoura	6 semanas	10-12°C	95%
Feta	De ovelha cru ou pasteurizado ou mistura ovelha e cabra	Coalho	32-34°C; 45-50 min.	Pelo peso da coalhada no cincho	-	Na massa e depois curados em salmoura	2 meses	Inicialmente a 14-16°C (7 dias) depois a 3-4°C	nA ^(*)
Fynbo	De vaca pasteurizado parcialmente desnatado	Coalho	30-31°C 20-25 min.	Com cocção até 38°C e lavagem da massa	Mecânica	Em salmoura	4 semanas	12-15°C	85-90%

(*) não aplicável.

Tabela 1.3 (continuação): Alguns parâmetros caracterizadores da tecnologia de fabrico dos diversos queijos estudados (Sá & Barbosa, 1990; Fox *et al*, 2004).

Queijo	Leite	Coagulante	Coagulação	Dessoramento	Prensagem Final	Salga	Cura		
							Tempo mínimo	Temperatura	Humidade relativa
Halloumi	De vaca pasteurizado. Tradicionalmente cru de ovelha ou por mistura ovelha e cabra	Coalho	32-34°C; 45-50 min.	Lento, pelo peso da coalhada no cincho ou mecânica	-	Na massa e eventualmente curados em salmoura	Consumido fresco ou armazenado a 4°C no soro.		
Kefalograviera	De ovelha cru ou pasteurizado ou mistura ovelha e cabra	Coalho	28 – 33°C 30-40 min.	Escaldamento até 48°C. Lento, com trabalho manual	Pelo peso da coalhada no cincho ou mecânica (24 h)	No início em salmoura e depois a seco.	3 meses	Inicialmente a 14 - 16°C e depois a 4°C	85-90%
Queijo	Matéria-prima	Preparação da massa	Fusão	Pasteurização	Prensagem final	Salga	Cura		
							Tempo mínimo	Temperatura	Humidade relativa
Fundido	Vários queijos ou um tipo de queijo + aditivos + ingredientes	Limpeza; trituração; mistura; homogeneização e adição de sais fundentes	70-75°C 15-20 min.	65-75°C	nA ^(*)	A seco.	nA ^(*) . Embalamento a uma temperatura inferior a 10°C.		

(*) não aplicável.

1.7.3 Implicações Sensoriais

A proteólise que ocorre no decurso da maturação do queijo é caracterizada pela quebra das ligações peptídicas da caseína nativa com formação subsequente de péptidos de diferentes dimensões e libertação de aminoácidos livres. As percepções sensoriais globais do queijo curado, no que concerne à proteólise, devem-se a alterações de textura, bem como à formação de péptidos, aminoácidos livres e compostos voláteis que podem atuar como substâncias sápidas e aromáticas, tendo sido sugerido que compostos com baixo peso molecular eram responsáveis pelo sabor base do queijo, apesar do papel exato desempenhado pelos péptidos de cadeias média e curta não estar ainda bem esclarecido (Sousa *et al.*, 2001; Upadhyay *et al.*, 2004).

O sabor amargo do queijo é fundamentalmente provocado pela formação de péptidos hidrófobos durante a proteólise. Foram identificados péptidos de cadeia curta, com massa a variar de 400-3000 Da, no extracto aquoso, responsáveis pelo sabor amargo do queijo Camembert. Os péptidos amargos foram isolados de um fragmento resultante da hidrólise da caseína β , pese embora ter-se concluído, com base na sua estrutura molecular, que a hidrofobicidade e a dimensão destes péptidos não contribuem, de modo isolado, para o sabor amargo. Pensa-se que a conformação dos péptidos também desempenhe um papel crucial (Upadhyay *et al.*, 2004).

Para além de péptidos, os ácidos orgânicos e sais têm sido identificados como potenciais compostos de sabor no queijo (Sousa *et al.*, 2001). Os aminoácidos livres são precursores de compostos voláteis mediante alterações catabólicas e reações entre aminoácidos e outros compostos (Yvon & Rijnen, 2001). A capacidade dos microrganismos no queijo para degradar aminoácidos a compostos aromáticos é altamente dependente da estirpe e pode explicar parcialmente como diferenças nos fermentos lácteos podem ter um grande impacto no aroma de queijos curados (Upadhyay *et al.*, 2004).

O sal é também descrito como um fator influente na formação de compostos de aroma e no desenvolvimento do aroma. Este efeito está associado à composição físico-química dos componentes voláteis e ao tipo e concentração de sal utilizado, o qual pode atuar na polaridade da superfície proteica e aumentar a retenção dos aromas. A percepção salgada do NaCl deve-se tanto ao catião Na^+ (70-85%) como ao anião Cl^- (30-15%). Em suma, estas propriedades podem dificultar a remoção total ou parcial do NaCl na manufatura de produtos (Cruz *et al.*, 2011). Num estudo recente, Phan *et al.* (2008) concluíram que a libertação de sódio durante a mastigação é influenciada fundamentalmente pela estrutura e composição do queijo, em particular pelo teor de humidade, enquanto a percepção do sabor salgado é limitada pela presença da gordura. Consequentemente, pôde concluir-se que a via de redução de sal em queijo sem afetar o sabor seria aumentar o teor em humidade e decrescer a quantidade de gordura.

Evidências sugerem que a redução lenta e gradual de sal pode não ser notada pelos consumidores, sendo considerada mais como um ajuste de sabores. Não obstante, quando o nível limite dessa redução é atingido, as modificações poderão ser detetadas pelo consumidor, arriscando-se a um decréscimo nas vendas. Uma das melhores estratégias para a indústria reduzir gradualmente a concentração de sal em alimentos processados, é iniciar com uma redução de 10-25%, a qual é pouco detetada pelo paladar humano, podendo não causar grande impacto na tecnologia e mantendo a redução gradual durante um período alargado. Reduções maiores podem ser mais facilmente atingidas para produtos com teor em sal mais elevado, enquanto noutros poderá usar-se a estratégia de substituição do sal para reduzir os níveis do mesmo ao longo de uma gama de categoria de produtos. Cátions substituintes como o potássio, o magnésio e o cálcio dão uma perceção ácida e menos salgada, comparativamente ao sódio, enquanto aniões (fosfatos e citratos), comparativamente ao cloreto, interferem mais diretamente no sabor, diminuindo o carácter salgado e deixando um gosto metálico residual associado ao fosfato (Cruz *et al.*, 2011). Deste modo, quando há a substituição do catião ou anião de NaCl na etapa da salga por compostos de peso molecular mais elevado, como o cloreto de potássio (KCl) ou o cloreto de magnésio ($MgCl_2$), esta influencia um sabor salgado menos intenso e um paladar mais amargo nos queijos. Em qualquer uma das opções, seja por redução ou por substituição, os fabricantes devem esperar, inicialmente, uma menor aceitação pelo consumidor. Porém, é importante salientar que esta situação irá mudar com o decorrer do tempo e os consumidores irão adotar o novo produto (Agarwal *et al.*, 2011).

Tendo em conta que o paladar é frequentemente um fator preponderante, mas não o único determinante na escolha do produto alimentar, a saúde cardiovascular pode ser um benefício de grande relevância entre os consumidores, devendo ser explorada pela indústria alimentar como meio para convencer o consumidor na compra de produtos alimentares baixos em sódio (Agarwal *et al.*, 2011). Para além da redução do sódio apresentar um cenário favorável em determinados segmentos populacionais (Liem *et al.*, 2011), a educação do consumidor e a rotulagem podem desempenhar também um papel crítico na aceitação de alimentos reduzidos em sódio (Drake *et al.*, 2011). Os fabricantes deviam aproveitar a oportunidade para mostrar ao consumidor que uma pequena perda na qualidade, no que respeita às características sensoriais do produto, pode ser compensada pela minimização de riscos ao nível da saúde pública (Johnson *et al.*, 2009). Assim, a rotulagem desempenha um papel-chave na aceitação dos produtos pelo consumidor. Os consumidores tendem a observar os produtos com uma visão mais favorável caso exista uma justificação redigida no rótulo para justificar certos atributos (Drake *et al.*, 2011). Desta forma, uma rotulagem esclarecedora, informando ao consumidor dos benefícios para a saúde em conjunto com boas propagandas de marketing dos géneros alimentícios reduzidos em sódio, irá proporcionar uma maior aceitação por parte do consumidor (Drake *et al.*, 2011). A indústria de fabrico de queijo devia estar preparada para dar a sua contribuição a este desafio.

1.8 Queijos Tradicionais

Produzem-se anualmente na Europa, nomeadamente, na França, Itália e Suíça cerca de 700.000 toneladas de queijos feitos a partir de leite cru, que representam uma proporção significativa do queijo produzido (aproximadamente 10% da produção total de queijo na União Europeia e na Suíça). Este tipo de queijos representa muitos anos de tradição e abrange um conjunto de produtos de território específico que se desenvolveu a partir de uma civilização rural e que podem ser considerados de fabrico artesanal. Adicionalmente, alguns queijos obtidos a partir de leite cru, na Europa, são salvaguardados pela proteção da Denominação de Origem Protegida (DOP), devido às propriedades únicas que apresentam (Beuvier & Buchin, 2004).

O avançar dos tempos resultou em alterações na produção de leite. Este é produzido numa área mais extensa, resultando numa mistura de leites de diferentes explorações e no aumento do tempo de transporte até ao posto de recolha, onde o leite é recepcionado. Uma das consequências é o desenvolvimento de populações microbianas diferentes daquelas presentes no leite das explorações pecuárias e a consequente necessidade de obtenção de leite de elevada qualidade higio-sanitária para fabrico, a qual é reforçada pelos requisitos microbiológicos legais. Assim, para conferir maior segurança ao produto final, alguns queijos tradicionais obtidos a partir de leite cru têm sido adaptados às exigências atuais mediante o fabrico destes a partir de leite submetido a tratamento térmico para destruição dos microrganismos patogénicos (Beuvier & Buchin, 2004), perdendo-se, no entanto, a especificidade que nalguns casos depende fortemente da flora microbiana autóctone.

O queijo tradicional de São João do Pico não é exceção, tentando aproximar-se do que está estabelecido para a DOP Queijo do Pico, na área abrangida pela ilha do Pico. Trata-se de um queijo tradicional, curado, de pasta mole, que resulta do esgotamento lento da coalhada após coagulação do leite cru de vaca, com coagulante de origem animal. De acordo com o Caderno de Especificações do Queijo do Pico, Denominação de Origem, o tempo de cura mínimo é de 20 dias em ambiente controlado, a temperatura de 10 a 14°C e humidade relativa de 80 a 85%. Apresenta formato cilíndrico, com diâmetros compreendidos entre 16 e 17 cm, altura entre 2 e 3 cm, crosta amarela e um peso médio de 650 a 800 g (Figura 1.2). A sua textura é irregular, com olhos, pouco compacta e muito untuosa. Possui um sabor ativo e salgado e um aroma característico intenso. Apresenta ainda um teor de gordura (referido à matéria seca) entre os 45 e 49% e um teor de humidade (referido ao queijo isento de gordura) de 67 a 71% (Despacho Normativo 32/96 de 29 de outubro).



Figura 1.2 - Queijo de São João fabricado na Queijaria do Pico (Sociedade de Produção de Laticínios de São João) assente sobre folhas de roca.

Os problemas de maior relevo, ainda a serem solucionados no que concerne ao uso de leite cru na manufatura do queijo, são o controlo sanitário rigoroso do gado bovino conjuntamente com as boas práticas de laboração que devem ser adotadas nas queijarias. Assim, por razões higio-sanitárias, na Queijaria do Pico, o queijo de São João tem sido produzido com leite de vaca pasteurizado com adição subsequente de fermentos lácteos, cloreto de cálcio, coalho animal e sal, este último adicionado diretamente nos grãos da coalhada.

A Figura 1.3 mostra o fluxograma do queijo do Pico obtido de leite pasteurizado, o qual se descreve em seguida.

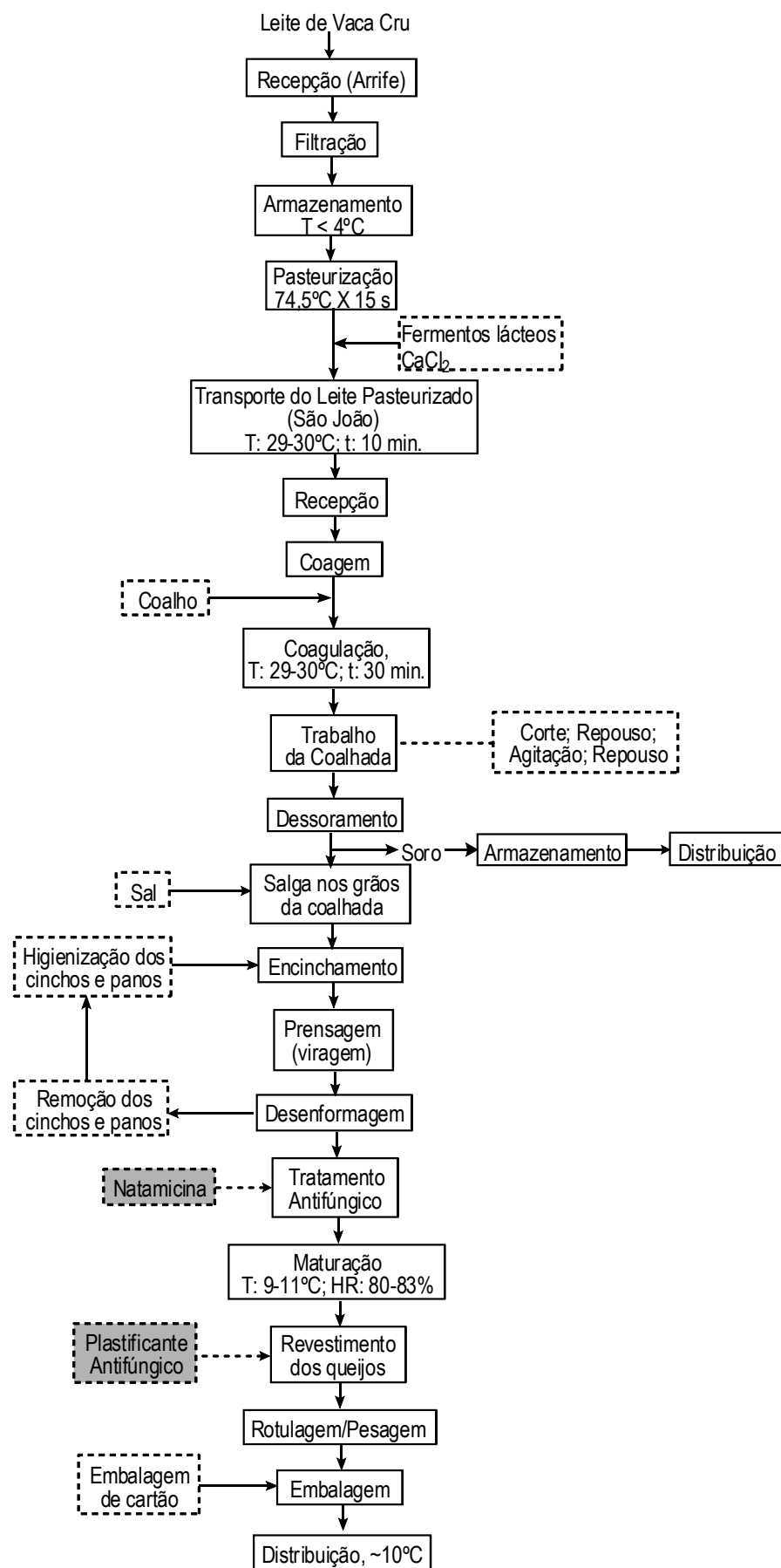


Figura 1.3 - Diagrama de fluxo do queijo São João produzido na Queijaria do Pico.

Recepção/filtração de leite cru: a recepção do leite é feita diariamente de manhã entre as 8:30 e as 10:00 e à tarde entre as 19:00 e as 20:00 (horário de Verão) e das 18:00 às 19:00 (horário de Inverno) no posto de recolha da Queijaria do Arrife. Nesta etapa, o leite é transportado e entregue pelos produtores, sendo descarregado para o tanque de recepção, operação durante a qual é efetuada a filtração do leite. Esta etapa de filtração do leite, é realizada na placa de filtro inox adaptada ao tanque de recepção.

Armazenamento Refrigerado a menos de 4 °C: Em seguida, o leite é transferido, por bombagem, para o tanque de refrigeração a uma temperatura não superior a 4°C, onde permanece armazenado para o fabrico do dia seguinte. A temperatura é monitorizada via um medidor de temperaturas digital.

Pasteurização: Todo o leite é pasteurizado antes do fabrico. A pasteurização é efetuada num permutador de placas. O binómio tempo/temperatura utilizado na pasteurização é de 74,5°C durante 15seg. Imediatamente após o tratamento térmico é efetuada a descarga direta para o tanque cisterna do veículo de transporte de leite.

Doseamento de fermentos e de cloreto de cálcio: esta etapa inicia-se, a meio da descarga do leite no tanque do veículo de transporte, com adição manual de fermentos lácteos, para acidificação do leite, e de cloreto de cálcio, para reposição do cálcio necessário à coagulação.

Transporte: logo após a descarga no veículo é feito o transporte do leite pasteurizado a uma temperatura de cerca de 30 °C. O transporte do leite tem como destino a Queijaria do Pico, em São João, sendo realizado num período de tempo de cerca de 10 min.

Recepção e Filtração: À recepção, é verificada a temperatura do leite pasteurizado proveniente da Queijaria do Arrife. Em seguida, é adaptado um pano higienizado à tubagem e, por trasfega, o leite é coado e recepcionado diretamente na cuba de coagulação, procedendo-se de imediato ao seu processamento.

Coagulação: O coagulante líquido, de origem animal, é adicionado durante o enchimento das duas cubas de coagulação de capacidade de 500L cada. Nesta etapa, a temperatura é mantida a cerca de 30°C.

Trabalho da Coalhada: Ao fim de aproximadamente 30 minutos, é verificado a formação da coalhada, procedendo-se ao corte manual, repouso e agitação da massa, com recurso a liras manuais.

Dessoramento: A massa é transferida manualmente, com auxílio de um balde, para a francela. O soro drena de dois modos: por uma torneira situada na base da cuba de coagulação e por um orifício

situado na inclinação inferior da francela, ambos em direção à tina de retenção, na qual a massa residual da coalhada é aproveitada.

Salga: Escorrido o soro da massa, o sal é adicionado diretamente aos grãos da coalhada e misturado manualmente o mais uniformemente possível e com esmagamento do grão, por ação dos dedos das queijeiras.

Encinchamento: Ainda na francela e após a adição de sal, a massa é colocada em cinchos plásticos providos de panos de algodão, previamente higienizados, que envolvem a massa calcada suavemente, permitindo um melhor esgotamento do soro e uma maior facilidade na desenformagem pós-prensagem.

Prensagem: Os queijos enformados são colocados na prensa pneumática, até adquirirem uma consistência minimamente firme de modo a possibilitar a viragem do queijo enformado no interior do cincho; após esta operação são recolocados novamente na prensa por mais cerca de uma hora.

Desenformagem: Após a prensagem, os queijos são retirados do cincho e os seus rebordos são removidos manualmente, com o auxílio de um utensílio de corte, de modo a obter o boleado dos queijos.

Tratamento Antifúngico: os queijos são passados por uma solução diluída de natamicina para prevenir o aparecimento de bolores e leveduras à sua superfície, durante a etapa da maturação.

Maturação: Os queijos seguem para as câmaras de cura onde são colocados em estantes de aço inoxidável ou cestos de plásticos de grau alimentar sobreponíveis. A maturação ocorre durante cerca de 17 dias. A temperatura e a humidade relativa são mantidas a 9-11°C e 80-83%, respetivamente, sendo a viragem dos queijos diária nos primeiros 8 dias e posteriormente em cada dois dias.

Revestimento: Na câmara de cura, é aplicado o plastificante antifúngico com uma esponja em toda a crosta do queijo.

Rotulagem, pesagem e embalagem: Os rótulos são colados à superfície dos queijos, com o auxílio do plastificante antifúngico. O conjunto de queijos é pesado e colocado na caixa de cartão canelado. Este conjunto de etapas é realizado, em geral, pouco antes da expedição do queijo ou com antecedência mínima necessária em função das vendas, para evitar aumentos de temperatura significativos nos produtos.

Distribuição: Durante o transporte local, são assegurados períodos de tempo de deslocação inferiores a uma hora, sendo a temperatura de transporte de 10°C ± 1°C.

1.9 Enquadramento do Trabalho e Objetivos

Este trabalho pretende contribuir para a redução do teor de sal no queijo de São João do Pico fabricado na Queijaria do Pico e que se caracteriza por um sabor salgado, apresentando uma percentagem média de sal, expressa em cloretos, de cerca de 2% em massa, podendo atingir, por vezes, 3% (m/m). Tal contribuição poderá revelar-se importante em termos futuros, possibilitando o reforço de estratégias comerciais e de diferenciação junto do consumidor. Desta forma, o estudo baseou-se na produção de queijos experimentais com redução de sal na etapa da salga nos grãos da coalhada, seja por substituição progressiva com cloreto de potássio, KCl, ou por decréscimo gradual do sal de cloreto de sódio exatamente nas mesmas proporções. Os queijos experimentais foram estudados comparativamente ao queijo controlo, no sentido de verificar se existiam diferenças significativas relativamente a parâmetros de qualidade e de segurança alimentar. Acresce ainda a realização do estudo da variabilidade entre modalidades de ensaio de ambas as tipologias de salga aplicadas. O trabalho experimental realizado visou o estudo de dois objetivos fundamentais:

- O primeiro respeitou à análise composicional e de perfis físico-químicos dos queijos experimentais de menores teores em sódio e do controlo, bem como a sua evolução ao longo da maturação. Esta fase também incluiu o estudo da influência dos decréscimos efetuados aos níveis de sal, isoladamente ou por substituição, ao nível da segurança microbiológica do produto no tempo de cura considerado mínimo para venda ao consumidor, tendo abrangido, também, a pesquisa de patógenos emergentes como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp..
- O segundo objetivo constou, fundamentalmente, em averiguar a exequibilidade de queijos São João com teor reduzido em sódio, em termos tecnológicos. Para tal, avaliaram-se a extensão e profundidade da proteólise secundária por recurso à análise das frações azotadas, nomeadamente, azoto solúvel em água, azoto não proteico e azoto aminoacídico em relação ao azoto total, ao longo da maturação e comparação das principais tendências observadas ao longo da evolução das mesmas. De modo análogo à análise microbiológica, foram avaliados os parâmetros de qualidade global associados às propriedades físicas e sensoriais dos diversos queijos manufaturados no tempo de cura considerado mínimo para este produto, no intuito de verificar a sua real viabilidade a nível de mercado. Assim, a caracterização física foi realizada pela análise de perfil de textura (TPA) e pela medição dos parâmetros da cor, referentes ao sistema de coordenadas $L^*a^*b^*$. No que concerne à avaliação sensorial, esta foi efetuada primeiramente pelo teste das diferenças (método do triângulo) e posteriormente pelo teste de aceitação, por recurso a uma escala hedonística de 9 valores, no qual foram avaliados os atributos da aparência, cor, textura, consistência, sabor, cheiro e pasta.

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Metodologia

O trabalho experimental foi realizado em quatro locais: (i) na Queijaria do Pico (Sociedade de Produção de Laticínios de São João) para o fabrico dos queijos controlo e experimentais; (ii) nas unidades laboratoriais de Ecotoxicologia e Microbiologia e de Análises Químicas do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e no laboratório do Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa para realização das análises microbiológicas, físico-químicas e bioquímicas e análise sensorial; e, (iii) no laboratório de reologia alimentar da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja para análise das propriedades de textura e parâmetros da cor. Todas as determinações foram realizadas em duplicado.

2.2 Fabrico do queijo

O queijo de São João do Pico foi produzido por três ocasiões na Queijaria do Pico (Sociedade de Produção de Laticínios de São João), nomeadamente, na 4.^a semana de agosto, 4.^a semana de setembro e 1.^a semana de novembro do ano de 2012. Todos os queijos foram obtidos a partir de leite bovino inteiro pasteurizado, sendo que a composição química dos mesmos poderá indicar, por vezes, alguma variabilidade devido à variação sazonal inerente à época do ano. O leite foi arrefecido a 29°C, após pasteurização (mínimo 74,5°C × 15s), tendo sido adicionados de imediato os fermentos lácteos mesófilos e solução aquosa de cloreto de cálcio no contentor fechado do veículo destinado ao transporte do leite até à queijaria de São João. Após cerca de 20 minutos de maturação do leite, foi adicionada quimosina de forma adequada, de acordo com indicações do fabricante, para 500 L de leite trabalhado, pelo que se segue a agitação do leite por 1 min. A coagulação do leite prolongou-se por cerca de 30 min, e a coalhada foi cortada com liras manuais, deixando-se em repouso por 15 min a 29-30°C, voltando-se a agitar posteriormente. O dessoramento foi feito por abertura da torneira situada na base da cuba de coagulação e por transferência da coalhada para a francela, por recurso a baldes, onde o soro escoou por um orifício situado na inclinação inferior da mesma para a tina de retenção.

Depois do esgotamento manual do soro, seguiu-se a etapa da salga, com adição direta de sal seco aos grãos da coalhada, tendo sido realizada a separação a olho da massa respeitante a 14/18 queijos, subdivididos, por sua vez, em 7/9 modalidades, respetivamente, e que correspondem a 84/108 litros de leite trabalhado. As diferentes tipologias de salga foram aplicadas nos queijos para o mesmo lote de leite. Assim, no queijo controlo foram utilizadas 48 g de NaCl para cada par de queijos (1C e 2C). Na redução por substituição por KCl (Panreac, Barcelona, Espanha) foram distribuídas para cada par de queijos de cada modalidade, com maior uniformidade possível: (i) 36g NaCl e 12g KCl para queijo com mistura NaCl/KCl (3:1, m/m) (1A1 e 2A1); (ii) 24 g de NaCl e de KCl para queijo

(1:1, m/m) (1B1 e 2B1); (iii) 12g NaCl e 36g KCl para queijo (1:3, m/m) (1C1 e 2C1); e, (iv) 48g KCl para queijo totalmente substituído por KCl (1D1 e 2D1). Para cada dois queijos onde foi feita apenas o decréscimo do teor de NaCl por redução utilizaram-se: (i) 36 g NaCl (queijos 1A2 e 2A2); (ii) 24g NaCl (queijos 1B2e 2B2); (iii) 12g NaCl (queijos 1C2 e 2C2); e, (iv) 0g para queijo sem sal (1D2 e 2D2). Seguiram-se as etapas do encinchamento, para que os queijos adquirissem a forma e dimensão específicas, da prensagem, em prensa pneumática com uma única inversão dos queijos nos cinchos, e o banho dos queijos em solução diluída de natamicina. Em seguida, os queijos seguiram para as câmaras de cura reguladas a 9-11°C e 80-83% de humidade. A viragem dos queijos foi efetuada diariamente nos primeiros 8 dias de cura e depois, regularmente, de 2 em 2 dias. As amostras foram colhidas aos 8, 17, 28 e 40 dias de maturação para caracterização físico-química e bioquímica, sendo que o 3.º lote foi destinado à avaliação sensorial (teste de aceitação), de textura, pelo teste de Análise de Perfil de Textura, e da cor, aos 17 dias. A caracterização microbiológica e a análise sensorial (prova triangular) foram efetuadas nas amostras colhidas aos 17 dias (nos dois primeiros lotes). Os resultados foram expressos como a média dos valores \pm desvio padrão correspondente. Os queijos controlo e experimentais foram fabricados em duplicado para cada modalidade, tendo sido replicados quatro vezes nos dois primeiros lotes (para o estudo ao longo da maturação). A Figura 2.1 mostra as várias etapas do fabrico do queijo de São João na Queijaria do Pico.



Figura 2.1 – Várias etapas do fabrico do queijo de São João na Queijaria do Pico (Sociedade de Produção de Lacticínios de São João) (setembro, 2011). Da esquerda para a direita apresentam-se as principais etapas de fabrico, nomeadamente: receção, coagulação, dessoramento, salga nos grãos da coalhada, encinchamento, prensagem e maturação.

2.3 Amostragem

A amostra é colhida para análise dependendo do fim a que esta se destina, isto é, do tipo de análise que se visa e cujas técnicas variam de uns casos para os outros (Sá & Barbosa, 1990). De um modo geral, as amostras de queijo foram colhidas na Queijaria do Pico, de modo semelhante ao consumo do queijo de São João.

Cada um dos lotes foi constituído por 14/18 queijos referentes a 6/7 modalidades e 1 controlo, no qual temos dois queijos por modalidade (Figura 2.2). Nos dois primeiros lotes de leite trabalhado, para estudar a evolução ao longo da maturação, fizeram-se quatro replicados (para a recolha de amostras aos 8, 17, 28 e 40 dias de maturação). No 3.º lote de leite trabalhado só se produziu um lote de

queijo, destinado à amostragem dos 17 dias de maturação, para a avaliação dos perfis de maturação, para avaliação dos perfis de textura e sensorial, pelo teste de aceitação, assim como para a caracterização físico-química e bioquímica.

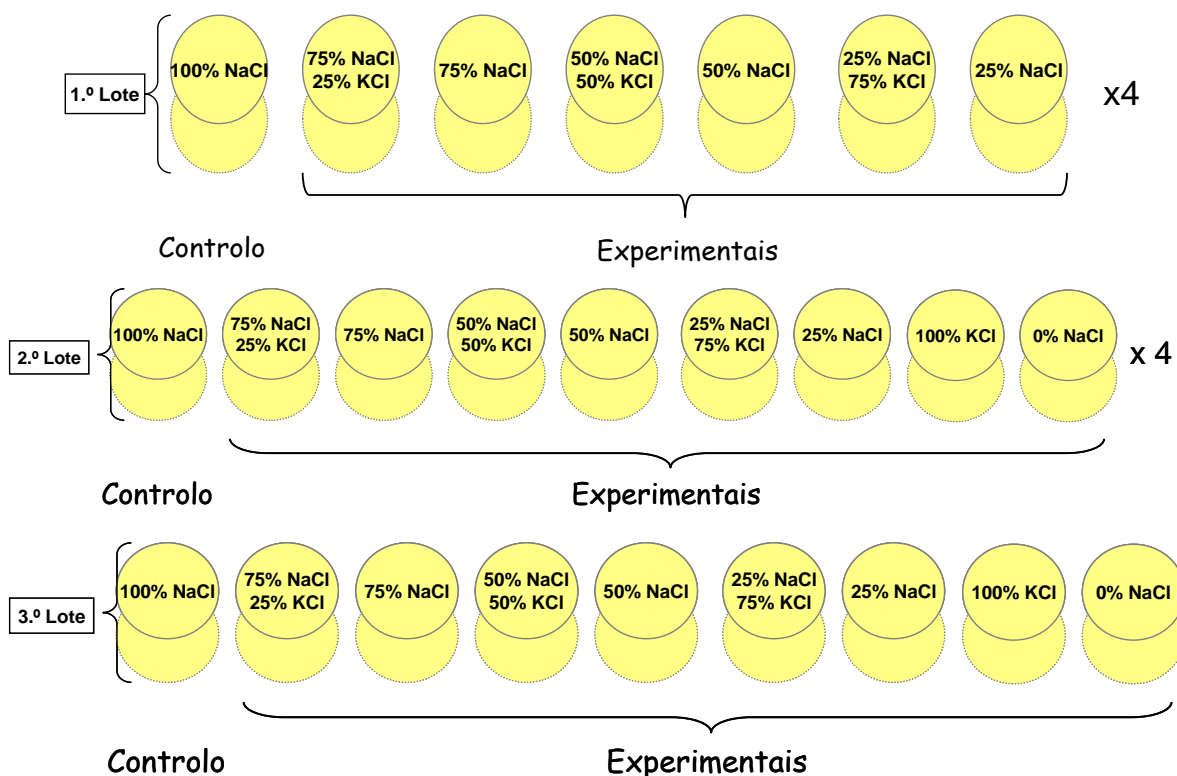


Figura 2.2 – Esquema de fabrico dos queijos controle e experimentais a partir dos três lotes de leite trabalhado.

Os recipientes com material destinado à colheita, quando enviados para fora do laboratório, foram protegidos de poeiras ou de outra contaminação proveniente do meio circundante. A geleira, de parede dupla, tinha como utilidade a carga das amostras até ao laboratório, assim como prevenir o desenvolvimento de bolores à superfície dos queijos, por possuir características de opacidade, hermeticidade, impermeabilidade à água e à gordura e por ser inerte relativamente ao alimento. Os materiais utilizados na recolha foram sacos plásticos adequados, adquiridos na venda a retalho, faca afiada e lisa, inalterável à esterilização e acumuladores térmicos para garantir a correta refrigeração das amostras até entrega destas no laboratório (IDF 50:2008; NP-1829:1982). Para colheita de amostras destinadas a análises microbiológicas, o material de colheita foi esterilizado por recurso ao algodão, álcool e isqueiro para flamejar o material que serve à colheita. No caso da colheita de amostras destinadas a análise físico-química, sensorial e de textura, o material utilizado na recolha estava limpo, seco e isento de qualquer tipo de odores.

A amostragem foi realizada tendo em conta o formato cilíndrico achatado e o tamanho do queijo a analisar, optou-se assim pelo método de amostragem de remoção de uma secção do queijo cortada

desde o centro até à casca, resultando numa fatia radial de espessura suficiente (IDF 50:2008). Todas as porções de amostra foram colhidas em quantidades semelhantes entre si.

Após a toma da amostra, é preciso ter dois cuidados: um, que respeita a análise físico-química; outro, à análise microbiológica. No primeiro caso, o único cuidado que importa ter é que se evite a evaporação da humidade, o que iria falsear o resultado quanto à composição global (Sá & Barbosa, 1990). Assim, para defender a amostra da evaporação guardou-se a mesma envolvendo-a em sacos plásticos adequados. No segundo caso, é necessário, além disto tirar uma amostra em condições assépticas. Assim, o material deve ser limpo e esterilizado. De notar que o material de colheita de amostras, mesmo esterilizado, deve ser flamejado no momento de ser utilizado e arrefecido no próprio alimento, mas não no ponto de colheita da amostra (Sá & Barbosa, 1990). Imediatamente após a colheita, a amostra deve ser devidamente acondicionada em invólucro plástico (NP-1828:1982). Acresce ainda que se teve o cuidado de não comprimir ou ralar a amostra e muito menos se procedeu à remoção da casca no momento da colheita (IDF 50:2008).

Caso as amostras se destinem às análises microbiológicas, devem ser colhidas primeiro as que se destinam à microbiologia, por recurso a técnicas assépticas e a material esterilizado, relativamente àquelas que se destinam às avaliações físico-química, bioquímica e sensorial (Sá & Barbosa, 1990). Assim, as amostras para avaliação microbiológica foram colhidas em primeiro lugar usando técnicas assépticas, ou seja, a amostra foi tomada ao abrigo de correntes de ar, tão rapidamente quanto possível e com cuidado para não contatar com nenhum objeto circunvizinho. As mãos do interveniente da colheita foram limpas e desinfetadas. Esterilizou-se o utensílio de corte que serve à colheita molhando-o com algodão embebido em álcool etílico a 96% fazendo-o passar, posteriormente, pela chama não fuliginosa para queimar o álcool. Posto isto, as amostras foram colhidas de modo semelhante às colheitas destinadas às análises físico-químicas e sensorial e em duplicado, sendo a quantidade retirada cerca de 100g ou superior. Uma vez que a análise não foi realizada imediatamente após a toma da amostra, esta foi introduzida no frio sem mais delongas.

Durante o transporte para o laboratório as amostras foram conservadas por controlo da temperatura entre 2°C e 5°C, mediante o uso de acumuladores térmicos no interior da geleira de parede dupla, de modo a evitar o desenvolvimento ou a destruição dos microrganismos antes da análise. A temperatura de armazenamento durante o transporte deve ser atingida o mais rapidamente possível após a colheita, e a sua manutenção até à entrega no laboratório deve ser conseguida, para preservação das características do alimento, ou seja, para que o estado das amostras se mantenha inalterado desde o momento da amostragem até ao momento de início do ensaio laboratorial. Visto dever sempre considerar-se o binómio tempo/temperatura e não estes dois parâmetros independentes entre si, considerou-se o envio para o laboratório no mais curto espaço de tempo, não superior a 24 h (NP-1829:1982).

Uma vez no laboratório, as amostras do queijo amanteigado de São João foram congeladas a -18°C , para as análises físico-químicas, ou refrigeradas até 5°C positivos, para o caso específico da caracterização microbiológica, da avaliação sensorial, de textura, pelo teste de Análise de Perfil de Textura, e da cor. Imediatamente antes da análise físico-química, descongelou-se o queijo a cerca de 2 e 5°C . Assim que a amostra atingia um estado que permitia o seu manuseamento, submetia-se uma determinada quantidade de queijo a uma trituração, após remoção da casca, uma vez que a amostra se esfarelava facilmente, resultando numa mistura homogênea, em que qualquer porção removida correspondia a uma parte representativa de todas as secções do queijo. A maioria dos ensaios foram realizados a 20°C .

No que concerne às análises microbiológicas, a preparação da amostra foi executada com os devidos cuidados de assepsia. Assim, utilizando-se bisturi ou faca, pesou-se uma quantidade de amostra para um copo ou erlenmeyer de boca larga, devidamente esterilizado e tapado com folha de alumínio. Adicionou-se um volume de solução diluente apropriado que, após conveniente agitação manual, permitiu medir a mistura com a pipeta (NP-1829:1982).

2.4 Métodos

2.4.1 Análises físico-químicas

2.4.1.1 Humidade e a_w

Na determinação da humidade usou-se o método gravimétrico (AOAC, 1990, método 948.12), sendo a diferença de massas da amostra determinada após secagem em estufa a $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, repetida até peso constante. Os resultados foram expressos relativamente à amostra húmida e em $\%(\text{m/m})$. A determinação da humidade foi efetuada de modo a permitir exprimir todas as concentrações em relação à matéria seca (*m.s.*). A matéria seca (%) representa a diferença entre o teor de humidade (%) e 100.

O parâmetro a_w , adimensional, foi determinado por higrometria, utilizando o aparelho *rotronic - Hygroskop DT*, medidor da atividade da água.

2.4.1.2 Cinza

Neste método de análise utilizou-se o método gravimétrico (AOAC, 1990, método 935.42) que consiste na incineração da amostra de queijo, resultando na oxidação completa da matéria orgânica por calcinação a uma temperatura não inferior a 550°C , durante duas horas. Após este período, arrefeceu-se a amostra num exsiccador e determinaram-se a quantidade de cinzas na amostra. Os resultados foram expressos em $\%(\text{m/m})$.

As cinzas representam o teor total de elementos minerais que resulta da destruição total do teor orgânico por calcinação, sendo que a sua preparação corresponde ao passo inicial do procedimento para caracterização elementar por espectrometria de absorção atômica.

2.4.1.3 Azoto total e proteína bruta

O azoto total determinou-se pelo método Kjeldahl (IDF 25:2008). Foi utilizado um digestor Tecator 2006 e um destilador Tecator Kjeltex 1002. Na determinação deste parâmetro, a amostra foi submetida a uma mineralização com ácido sulfúrico 95-97% (m/m), a quente, na presença de uma mistura catalisadora metálica, sulfato de potássio e sulfato de cobre. A digestão leva à conversão de todo o azoto orgânico em ião amónio, que é posteriormente convertido em amoníaco, por adição de hidróxido de sódio, destilado em corrente de vapor com excesso de solução de ácido bórico, sendo este posteriormente doseado, por titulação, com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, ambas as soluções de 0,02N. O teor em azoto é calculado a partir da quantidade de ião amónio produzido.

A proteína bruta foi determinada por quantificação do azoto total pelo método acima descrito e convertendo este valor em proteína bruta através da multiplicação da percentagem de azoto total pelo fator de conversão 6,38, conforme disposto na IDF 25:2008 e considerando que a totalidade do azoto está na forma proteica.

Os resultados foram expressos em % (m/m).

2.4.1.4 Cloretos

Este método baseou-se no método de titulação potenciométrico estabelecido na IDF 88:2006 e no método argentimétrico (método de Mohr), em que uma porção de amostra foi suspensa em água destilada quente, sendo esta suspensão acidificada com ácido nítrico 4M, neutralizada com solução de hidróxido de sódio, na presença de fenolftaleína, seguindo-se, posteriormente, a titulação dos iões cloreto com uma solução de nitrato de prata 0,1M, na presença de cromato de potássio como indicador de iões cloreto presentes. O cloreto de prata formado é quantitativamente precipitado antes da visualização da cor pêssego obtida devido à formação do cromato de prata. Os resultados foram expressos em % (m/m) de iões cloreto, de acordo com o caderno de especificações relativo ao Queijo do Pico.

2.4.1.5 Gordura

Este método de análise consiste na separação da matéria gorda da amostra por decantação líquido-líquido de misturas bifásicas constituídas por líquidos imiscíveis de densidades diferentes, após dissolução das proteínas do queijo pelo ácido clorídrico (AOAC, 1990, métodos 933.05 e 905.02), sendo o teor de gordura calculado por gravimetria. A separação do conjunto das substâncias lipídicas

é facilitada pela adição de uma pequena quantidade de álcool etílico, conjuntamente com lavagens sucessivas em hexano.

Pesou-se cerca de 1g, até à mg, na balança analítica (Mettler Toledo AB204) para erlenmeyer de 100 mL. Posteriormente, adicionou-se 9 mL de água destilada e 1 mL de NH_4OH (25% m/m NH_3). Misturou-se completamente e aqueceu-se a mistura a temperatura baixa até amaciamento efetivo da caseína e neutralizou-se com HCl. Em seguida, juntaram-se 10 mL de HCl 37% (m/m), cobriu-se o recipiente com vidro de relógio e aqueceu-se até à ebulição durante 5 min. Deixou-se arrefecer até temperatura ambiente e transferiu-se a mistura para ampola de decantação. Lavou-se a mesma com 10 mL de etanol, conjuntamente com 20 mL de hexano. Após repouso da mistura para desaparecimento da emulsão, procedeu-se à decantação. A fase orgânica foi lavada por mais duas vezes consecutivas com 15 mL de hexano. Juntaram-se as fases orgânicas resultantes e evaporou-se o hexano em banho a 60°C. Posteriormente, secaram-se todas as fracções de gordura obtidas em estufa (WTB binder E28) a $103 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 30 minutos. Após este período, arrefeceu-se no exsiccador e pesou-se, registando-se o peso. Os resultados foram expressos em % (m/m).

2.4.1.6 Lactose

O método analítico consiste na dispersão da amostra de queijo em água, seguida de defecação pelo sulfato de zinco e pelo ferrocianeto de potássio e filtração, seguida de adição de uma solução cúprica e determinação gravimétrica do precipitado de óxido cuproso formado por ação redutora da lactose segundo a técnica de Munson e Walker (NP 2104:1988).

A uma dispersão de cerca de 5 g de queijo em 100 mL de água quente destilada a 70 °C, adicionaram-se 2 mL de solução de sulfato de zinco e 2 mL de solução de ferrocianeto de potássio, sob agitação vigorosa, para defecação da amostra, perfazendo-se o volume a 200 mL, tendo-se filtrado posteriormente a solução. A 100 mL do filtrado obtido adicionaram-se 25 mL de sulfato de cobre e 25 mL de solução alcalina tartárica, aquecendo-se a mistura durante 6 minutos após a ebulição. Após ligeiro arrefecimento, filtrou-se a pressão reduzida, ainda a quente, para um cadinho tarado, previamente lavado com solução diluída de ácido nítrico e água quente, seco em estufa e arrefecido em exsiccador. Usou-se água destilada a 60°C para lavagem. Os cadinhos usados na filtração foram secos em estufa a cerca de $103 \pm 2^\circ\text{C}$, arrefecidos no exsiccador e registou-se o seu peso.

Os resultados obtidos foram convertidos, com o auxílio de tabelas, em lactose hidratada, por verificação da massa corrigida correspondente de óxido cuproso e cálculo posterior de acordo com a fórmula disposta na NP 2104:1988.

2.4.1.7 pH

A medição de pH foi realizada pelo método potenciométrico. Pesaram-se c. 5 g de amostra de queijo, adicionaram-se 50 mL de água destilada a 40°C e agitou-se vigorosamente a solução, durante 15 min, pelo que se procedeu à leitura do pH.

2.4.1.8 Acidez

Este método analítico consistiu na neutralização dos ácidos livres contidos no queijo, por solução alcalina titulada de acordo com o método volumétrico (AOAC, 1990, método 920.124). A 5 g de amostra de queijo, adicionaram-se 50 mL de água destilada a 40°C e agitou-se vigorosamente a solução até completa homogeneização, tendo-se procedido, posteriormente, à sua filtração. Titularam-se 25 mL do filtrado, correspondentes a 2,5g de amostra, com solução aquosa NaOH 0,1N, em presença de fenolftaleína, até obter um tom rosa pálido. Os resultados foram expressos em % (m/m) ácido láctico, sabendo que 1 mL de solução 0,1N NaOH corresponde a 0,0090 g de ácido láctico.

2.4.1.9 Elementos minerais (Ca, Na, K, Mg)

As cinzas foram submetidas a digestão a quente com ácido nítrico de acordo com IDF 119:2007. A determinação dos metais (cálcio, sódio, potássio e magnésio) nas soluções digeridas dos queijos (ou nas suas diluições, quando necessário) foi efectuada por espectrofotometria, num espectrómetro de absorção atómica (Solaar M Series, Thermo Scientific), por atomização em chama de ar-acetileno ou acetileno/protóxido de azoto, sendo que a sua absorção foi medida em comprimentos de onda específicos de cada metal.

A calibração efetuada aquando da medição dos metais, foi realizada recorrendo a soluções padrão monoelementares, preparadas com os reagentes utilizados nas extrações. Estas soluções padrão foram preparadas a partir de soluções de 1000 mg.L⁻¹, certificadas. Em todas as metodologias que envolveram a determinação de metais, foi utilizada água desionizada, sendo todo o material previamente lavado com uma solução de ácido nítrico 2M (em contato durante 24h) e com água desionizada.

2.4.1.10 Fósforo total

Digestão a quente com ácido sulfúrico (95-97%, m/m) e peróxido de hidrogénio (30% m/v) (IDF 33:2010). Os fosfatos do digerido foram determinados por espectrofotometria de absorção molecular, através da formação de um complexo corado com uma solução de molibdato de amónio, na presença de ácido ascórbico e de tartarato de potássio e antimónio (Watanabe e Olsen, 1965).

2.4.2 Avaliação da proteólise

O grau de proteólise foi avaliado aos 8, 17, 28 e 40 dias de cura, através da análise das frações azotadas.

2.4.2.1 Azoto solúvel em água (WSN)

A fração WSN foi obtida por homogeneização da amostra de queijo com água de acordo com o método descrito em Kuchroo & Fox (1982), com as modificações descritas em Silva (2000). Sumariamente, uma toma de 10 g de queijo ralado foi macerada com 100 mL de água destilada a 40°C, durante 5 min. O homogeneizado foi aquecido em banho de água a 40°C por 1 h, sendo posteriormente centrifugado a 3000 g durante 45 min; o sobrenadante foi filtrado, com recurso a papel de filtro Whatman n.º 40 ou equivalente, tendo sido conservado no frio até análise. O azoto solúvel em água foi determinado no filtrado pelo método de Kjeldahl, tendo-se utilizado alíquotas de 10 mL do filtrado.

O teor em azoto do extrato aquoso do queijo foi expresso por unidade de massa de azoto total (TN), sendo indicado como WSN/TN.

2.4.2.2 Azoto não proteico (TCASN)

A obtenção da fração solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 12% de concentração final (TCASN) baseou-se no método descrito por Silva (2000). Assim, uma fração foi preparada por adição de 20 mL de uma solução aquosa de 24% TCA (m/v) a 20 mL do extrato solúvel em água; a mistura foi agitada e mantida no frio durante 24 h para precipitação seletiva dos componentes azotados, sendo posteriormente filtrada através de papel de filtro Whatman n.º 40 ou equivalente. Alíquotas de 15 mL a 20 mL de filtrado foram analisadas pelo método de Kjeldahl.

O teor em azoto solúvel em TCA a 12% do queijo foi expresso por unidade de massa de azoto total (TN), sendo indicado como TCASN/TN.

2.4.2.3 Azoto aminoacídico (PTASN)

O teor em azoto solúvel em ácido fosfotúngstico (PTA) a 5% de concentração final (PTASN) baseou-se no método descrito por Silva (2000). Foi preparada uma fração por adição de 14,0 mL de ácido sulfúrico 3,95M e 6,0 mL de PTA a 33% (m/v) a 20 mL do extrato solúvel em água. A mistura foi agitada e mantida em frio durante 24 h para precipitação seletiva dos compostos azotados, sendo posteriormente filtrada através de papel de filtro Whatman n.º 40 ou equivalente. Alíquotas de 15 mL a 20 mL de filtrado foram analisadas pelo método de Kjeldahl.

O teor em azoto solúvel em PTA a 5% do queijo foi expresso por unidade de massa de azoto total (TN), sendo indicado como PTASN/TN.

2.4.2.4 Azoto amoniacal (NH₃)

O teor em azoto amoniacal (NH₃) baseou-se no método Kjeldahl (IDF 25:2008), eliminando-se o passo da digestão da amostra. O azoto amoniacal presente em alíquotas de 30 mL a 40 mL do extracto solúvel em água, não digerido, é destilado e doseado por titulação.

O teor em azoto amoniacal do queijo foi expresso por unidade de massa de azoto total (TN), sendo indicado como NH₃/TN.

2.4.3 Análises Microbiológicas

Aos 17 dias de maturação, efetuou-se a recolha de aproximadamente 100 g de cada amostra de queijo São João, em condições de assepsia, para sacos estéreis e transportou-se as amostras para o laboratório em recipiente isotérmico, tendo-se procedido a contagem de totais viáveis a 30°C, *Enterobacteriaceae*, Estafilococos coagulase positiva, bolores e leveduras. Também se pesquisou a presença de microrganismos patogénicos no queijo, nomeadamente, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, de acordo com as normas em vigor.

A preparação das amostras foi efectuada de acordo com a NP 1829, tendo-se utilizado aparelhos e utensílios de material inerte, limpo e esterilizado. Esta preparação foi efectuada de modo a conduzir a uma perfeita uniformidade da distribuição dos microrganismos e com os indispensáveis cuidados de assepsia de modo a evitar qualquer contaminação.

A suspensão inicial e a série de diluições decimais foram preparadas de acordo com a ISO 6887-1 (1999). A contagem de microrganismos foi realizada seguindo a ISO 8199 (2005).

A contagem de microrganismos totais viáveis a 30°C foi realizada após inoculação de 1 mL da suspensão-mãe e das respetivas diluições decimais, por incorporação, em meio de cultura PCA ("Plate Count Agar", Becton, Dickinson and Company) e incubação a 30°C durante 72h (NP 4405:2002). As *Enterobacteriaceae* foram determinadas após incorporação de 1 mL da suspensão-mãe em meio sólido de bilis, cristal-violeta e glucose (VRBGA, Biokar Diagnostics) e incubação a 37°C durante 24h de acordo com NP 4137:1991. De notar que as placas com meio de cultura VRBGA solidificado foram novamente cobertas com uma camada fina do mesmo meio antes da incubação. Após contagem foram selecionadas cinco colónias características para os ensaios de confirmação (NP 4137:1991). A contagem de bolores e leveduras (NP 1934:1986) foi efectuada, após sementeira de uma quantidade determinada da suspensão-mãe e das respetivas diluições decimais (0,2 mL), em

meio de cultura apropriado (meio Rose Bengal Chloramphenicol Agar, Biokar Diagnostics) e incubação das placas semeadas, durante 120 ± 2 h à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

A contagem de *Estafilococos* coagulase positiva (ISO 6888-1:1999) foi realizada por sementeira em superfície de uma quantidade determinada da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais (0,1 mL), em meio de cultura apropriado (meio Baird Parker, Himedia, contendo emulsão de gema de ovo com telurito e sulfamesatina), seguindo-se a incubação das placas semeadas, durante 44 ± 4 h à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Depois da incubação, foram selecionadas as colónias características para confirmação, pela prova da coagulase (ISO 6888-1:1999).

A pesquisa de *E. coli* (NP 2308:1986) foi feita por repicagem a partir de cada um dos tubos de caldo verde brilhante (Biokar Diagnostics) que deram resultado positivo na pesquisa e contagem de bactérias coliformes (ISO 4831:2006). Na pesquisa e contagem de bactérias coliformes, uma série de tubos contendo caldo verde brilhante foram inoculados com quantidades apropriadas da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais, sendo incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 24 ± 2 h e 48 ± 4 h de incubação, foi feita a repicagem dos tubos considerados positivos (com turvação e formação de gás), de uma ansa com cultura para caldo verde brilhante e outra para água peptonada (1% Peptona (Becton, Dickinson and Company) + 0,5% NaCl), seguindo-se a incubação em banho de água a $44,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 h. Consideram-se positivos os tubos que apresentam resultados positivos simultaneamente (verificação de produção de gás no meio de cultura de caldo verde brilhante e de produção de indol na água peptonada) (NP 2308:1986).

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi efetuada por fases (ISO 6579:2002). Pré-enriquecimento por sementeira da toma num meio líquido não seletivo (água peptonada tamponada: 1% Peptona, Becton, Dickinson and Company, + 0,5% NaCl + 0,9% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 0,15% KH_2PO_4), seguindo-se incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 h. Enriquecimento em meio líquido seletivo Rappaport e Vassiliadis com soja (Merck) e caldo de selenito-cistina (Merck, em substituição do caldo MKTTn) por sementeira da cultura obtida no pré-enriquecimento e incubação, respetivamente, a $41,5^\circ\text{C}$ e a 37°C , durante 24 horas. Foi feito o isolamento de colónias tipo *Salmonella* de cada meio de cultura anterior por sementeira em meios sólidos seletivos, XLD (Oxoid), bismuto sulfito agar (Becton, Dickinson and Company) e verde brilhante e vermelho de fenol (Merck), incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 24 ± 3 h. Repicagem das colónias características e confirmação, tendo em atenção a verificação do crescimento diferenciado nos meios de isolamento seletivo e nos meios de confirmação de acordo com Carvalho *et al.*, 2007.

A deteção e contagem de *Listeria monocytogenes* foi realizada pelo método horizontal descrito na ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004, inoculando 0,1 mL de suspensão-mãe preparada em caldo de ressuscitação (água peptonada tamponada) à superfície do meio ALOA (em placas comercializadas preparadas, Compass® *Listeria* Agar, Biokar Diagnostics) e incubação a 37°C durante 24 a 48 horas.

Confirmação das colónias características em meio sólido (Confirm' L. Mono Agar®, Biokar Diagnostics).

2.4.4 Propriedades físicas

Foi realizada a caracterização física dos queijos São João do 3.º lote aos 17 dias de maturação, relativamente aos tratamentos da salga aplicados, por recurso à análise de perfil de textura e determinação dos parâmetros da cor associados à pasta e à crosta.

2.4.4.1 Análise de Perfil de Textura

A análise de perfil de textura em penetração na pasta foi efetuada no texturómetro “Texture Analyser Model TAHDi®” (Stable Micro Systems, Godalming, UK), no qual foram utilizados uma célula de carga de 5 kg “Interchangeable Low Force Load Cells Model LC/5” e uma sonda cilíndrica de alumínio de 20 mm de diâmetro (P/20), à temperatura de 20 ± 1 °C. As condições de teste programadas foram velocidade de teste $1,00 \text{ mm.s}^{-1}$, tempo de repouso entre o primeiro e o segundo ciclo 5 s, profundidade de penetração da sonda 10 mm de acordo com Alvarenga (2008). Dos texturogramas força-tempo (mínimo de 5 réplicas para cada queijo) obtidos pelo teste TPA, determinaram-se os parâmetros da dureza (N) e adesividade (-N.mm), a partir dos quais foi calculada a coesividade (adimensional) (Alvarenga, 2008).

2.4.4.2 Cor

A análise da cor foi realizada utilizando um colorímetro CR-300® (Minolta, Osaka, Japan). A determinação das coordenadas L^* , a^* e b^* foi efetuada de acordo com o sistema definido pela “Comission Internationale de L'éclairage – CIE 1976 $L^*a^*b^*$ Uniform Colour Space” usando, para calibração, o branco padrão ($L^* = 97,10$; $a^* = -4,88$; $b^* = 7,04$), em que L^* representa a luminosidade da cor que varia entre zero (negro) a 100 (branco), a^* corresponde à variação verde a vermelho (-60 é verde e +60 é vermelho) e b^* corresponde à tonalidade situada entre azul e amarelo (-60 é azul e +60 é amarelo) (Alvarenga *et al.*, 2008, 2011). Em cada queijo e respetivo duplicado foram realizadas 10 medições à pasta, juntamente com outras 20 junto à crosta (interior e exterior).

2.4.5 Análise Sensorial

Aos 17 dias de maturação, foram realizadas duas provas triangulares aos dois primeiros lotes fabricados e um teste de aceitabilidade do produto ao terceiro lote produzido.

2.4.5.1 Prova Triangular

Procedeu-se à realização do teste triangular para detecção das diferenças relativas aos tratamentos de salga aplicados ao queijo São João, nos dois primeiros lotes ao 17.º dia de maturação, no intuito de identificar qual a amostra diferente dentro de um conjunto de diversas propriedades sensoriais. O painel foi constituído por 30 membros (18 femininos e 12 masculinos, em que a média do grupo de idades se situou, maioritariamente, entre os 18 e os 30 anos dentro de um quadro de idades que variou entre 18 e mais de 51 anos) que foram selecionados com base na vontade e na disponibilidade em participarem na prova sensorial. Os provadores foram alunos de licenciatura, mestrado e de doutoramento, essencialmente, e ainda, bolseiros, docentes e pessoal pertencente ao quadro de funcionários da FCT-UNL. De um modo geral, os provadores não foram informados dos detalhes inerentes a este projeto e também não estavam familiarizados com as características do queijo de São João, pelo que lhes foi dado uma explicação prévia relativa ao produto. Foram-lhes dadas diferentes amostras comerciais do queijo padrão, bem como amostras experimentais tendo-se procedido da seguinte forma para o teste do triângulo: amostras respeitantes a dois queijos diferentes foram agrupadas num conjunto de três, sendo duas iguais e uma diferente, com seis possibilidades de sequenciação diferentes num total de 30 testes para cada tipo de tratamento de salga aplicado, de acordo com o ponto 7.1 da norma BS ISO 4120:2004. Foram realizadas duas sessões no dia da prova, sendo uma de manhã e outra à tarde, passado um período de tempo mínimo de uma hora relativamente à última refeição dos provadores. As amostras foram apresentadas em cubos de cerca de 1,5 cm³ à temperatura ambiente ($18 \pm 2^\circ\text{C}$), em pratos brancos de plástico, dispostas da esquerda para a direita, tendo-lhes sido atribuído um código numérico aleatório de três dígitos. Os provadores foram instruídos a que avaliassem as amostras pela ordem em que elas lhes fossem apresentadas, tendo o cuidado de enxaguar a boca com água, entre provas, utilizando para isso um copo de plástico de 100 mL, com água, colocado à sua disposição. No final pediu-se para que indicassem na folha de prova (*vide* Anexo I.A) a amostra que considerassem diferente relativamente aos atributos do sabor, textura e cheiro sobre a aparência do queijo, tendo sido incluída também uma secção destinada a comentários no final do mesmo questionário. Para reconhecimento de uma diferença apreciável entre amostras controlo e experimental, foram contabilizadas o número de respostas corretas, determinando-se, posteriormente, se este número era não inferior ao número mínimo dado pela tabela estatística de referência disposta no Anexo A da BS ISO 4120:2004, para um nível de confiança de 95%.

2.4.5.2 Avaliação hedónica

Quarenta e dois provadores participaram no teste de aceitabilidade (em que as médias de idade se situaram entre 18 e 30 anos dentro de um quadro de idades que variou entre 18 e mais de 51 anos). Os provadores foram essencialmente estudantes de licenciatura, mestrado e de doutoramento, e ainda bolseiros, docentes e pessoal pertencente ao quadro de funcionários da FCT-UNL, que foram selecionados com base na vontade e na disponibilidade em participarem na prova sensorial. Os provadores avaliaram as amostras de queijo de um modo semelhante ao descrito no ponto anterior, tendo sido realizados 30 testes de aceitação para cada modalidade de ensaio, inclusivamente à amostra padrão. Todas as amostras foram preparadas no próprio dia, tendo sido servidas à temperatura ambiente ($18 \pm 2^{\circ}\text{C}$). As amostras foram apresentadas em cubos de $1,5 \text{ cm}^3$ num prato branco de plástico, tendo sido rotuladas com um código numérico aleatório de três dígitos. Foi providenciado enxaguamento da boca entre amostras. Foi solicitado aos provadores que pontuassem as amostras, após degustação, relativamente aos atributos da aparência, cor, textura, consistência, sabor, cheiro e pasta numa escala de 9 pontos (1 = desgosto totalmente a 9 = gosto totalmente; Kamleh *et al.*, 2012). A qualidade global foi calculada a partir da média respeitante às sete propriedades sensoriais avaliadas. Os provadores foram incitados a descrever quaisquer defeitos detetados ao longo da avaliação, relativos à aparência (p. ex.: seca, húmida, fissuras), pasta (p. ex.: presença de olhos, quebradiça, esponjosa, pastosa, dura) e sabor (p. ex.: ácido, amargo, metálico, salgado, picante, fermentado e azedo) (adaptado de Katsiari *et al.*, 1997). A ficha de prova (*vide* Anexo I.B) quantitativa, utilizada para obtenção da aceitação comercial dos queijos com tratamentos de salga diferentes, apresenta-se na Figura 2.3.

QUALIDADE GLOBAL:

Aparência

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Cor
(branca a amarela
ténue)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Textura
(irregular, pouco
compacta)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Consistência
(mole, pastosa)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Sabor

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Cheiro

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Pasta
(amanteigada)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Comentários^(*):

--

^(*) Descreva possíveis defeitos que tenha detectado ao longo da apreciação, relativos à aparência (p. ex.: seca, húmida, fissuras), pasta (p. ex.: presença de olhos, quebradiça, esponjosa, pastosa, dura) e sabor (p. ex.: ácido, amargo, metálico, salgado, picante, fermentado e azedo).

Figura 2.3 – Ficha de prova quantitativa utilizada para obtenção da aceitação comercial do produto (1 = desgosto totalmente a 9 = gosto totalmente).

2.4.6 Análise Estatística

Os valores médios e respetivos desvios padrão para cada parâmetro experimental, associados à caracterização físico-química, bioquímica, microbiológica, física e sensorial, foram obtidos a partir de duplicados de oito queijos experimentais, referentes a duas tipologias de salga por redução/substituição de cloreto de sódio, e de duas amostras de queijo controlo. De salientar que para as contagens viáveis dos diversos grupos microbianos foi necessário efetuar a transformação logarítmica para garantir uma distribuição independente e normal dos resultados, tal como requerido para a validação desta análise.

Todos os dados experimentais obtidos foram avaliados mediante a Análise de Variância utilizando o *software Analysis Toolpack* para o Windows (suplemento do Microsoft Excel, 2010). Sempre que foram identificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de salga, os respetivos

valores médios eram comparados dois a dois pelo teste T-Student. Também, após determinação de diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tempos de maturação, aplicou-se ANOVA-fator único para comparação dos respectivos valores médios entre pares de dias de cura analisados.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Traçado Experimental

Foram fabricados queijos São João, a partir de leite pasteurizado, nos quais foram aplicados diferentes tratamentos de salga (m/m) na massa da coalhada: 100% NaCl (amostra controlo), 3NaCl:1KCl, 1NaCl:1KCl, 1NaCl:3KCl, 100%KCl, 75%NaCl, 50%NaCl, 25%NaCl, e isenção total de NaCl. Os queijos foram posteriormente curados a 11°C durante 40 dias.

O primeiro lote de fabrico, designado por A, foi constituído por 56 queijos, correspondentes a 14 queijos por colheita efetuada ao longo da cura, com seis modalidades experimentais até 75% de redução/substituição de sal, mais uma modalidade controlo. No segundo lote (B) fez-se uma alteração respeitante ao acrescento de mais duas modalidades de fabrico experimentais, queijo salgado apenas com KCl e queijo isento de sal, contabilizando um total de 72 queijos, correspondentes a 18 queijos por colheita. Por fim, fabricou-se um terceiro lote (lote C) com 18 queijos experimentais, similar ao lote B em modalidades constituintes, para uma única colheita. Cada modalidade foi composta por dois queijos. Foi atribuída uma codificação alfanumérica a cada modalidade de ensaio de modo a permitir a sua distinção.

Tabela 3.1: Codificação identificativa alfanumérica atribuída aos queijos experimentais.

Código	Modalidade de salga (m/m)	Código	Modalidade de salga (m/m)
C	100% NaCl	A2	75% NaCl
A1	3NaCl:1KCl	B2	50% NaCl
B1	1NaCl:1KCl	C2	25% NaCl
C1	1NaCl:3KCl	D2	0 % NaCl
D1	100% KCl		

A colheita das amostras foi realizada aos 8, 17, 28 e 40 dias de maturação e, após o transporte das amostras em caixas isotérmicas para o laboratório, procedeu-se às análises laboratoriais para caracterização físico-química, mineral e avaliação da proteólise ao longo da maturação, e estudo da sua variação entre modalidades de ensaio de redução/substituição de cloreto de sódio. A caracterização físico-química e mineral consistiu na determinação da humidade, proteína, cloretos, cinza, matéria gorda, lactose, acidez, pH e a_w , e minerais, como o sódio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo, segundo métodos normalizados ou internos. A proteólise foi avaliada por fracionamento do azoto solúvel em água (WSN), em ácido tricloroacético (TCASN) e ácido fosfotúngstico (PTASN) e azoto amoniacal, tendo-se expresso todas as frações azotadas em % do azoto total, para medida dos índices de extensão e profundidade da proteólise.

Pelo facto da Queijaria do Pico ter atribuído uma cura mínima de 17 dias para a comercialização do queijo tradicional de São João de leite pasteurizado, analisaram-se os diversos queijos experimentais

neste período de maturação, relativamente à sua segurança microbiológica, aos parâmetros de qualidade associados aos atributos sensoriais e às propriedades físicas do produto, no intuito de perceber a viabilidade deste produto alternativo para determinados nichos de mercado e verificar até que ponto a redução de sal neste queijo é exequível. Assim, para avaliar a segurança alimentar de todas as modalidades de redução/substituição de sal no momento do seu consumo realizaram-se análises microbiológicas nas 24 horas subsequentes à recolha das amostras, nos lotes A e B. As análises microbiológicas incluíram a contagem de totais viáveis a 30°C, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras e pesquisa de microrganismos patogénicos, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Ainda nesta fase de maturação, procedeu-se à avaliação sensorial dos dois primeiros lotes produzidos, tendo para isso realizado a prova triangular para deteção das diferenças, com o objetivo de investigar se as alterações imprimidas a nível tecnológico incorriam em diferenças apreciáveis nos queijos experimentais finais comparativamente ao queijo padrão no que concerne às propriedades do sabor, textura e cheiro sobre a aparência do queijo.

O terceiro lote produzido, lote C, destinou-se à avaliação de parâmetros de qualidade do produto relativos às propriedades físicas e sensoriais aos 17 dias de cura. A caracterização física dos queijos foi realizada por recurso à análise de perfil de textura (TPA) tomando como parâmetros indicadores do comportamento mecânico, a dureza, a adesividade e a coesividade. A cor foi medida utilizando o sistema de coordenadas L*a*b*. Este estudo foi ainda complementado, através de provas sensoriais, por meio da avaliação hedónica de todos os queijos experimentais, inclusivamente da amostra padrão, numa escala de 9 valores, segundo a tabela de apreciação criada no âmbito do estudo para o queijo São João, tendo sido apreciados os atributos da aparência, cor, textura, consistência, sabor, cheiro e pasta.

A análise estatística foi efetuada com o *software Analysis Toolpack* para o Windows para um nível de confiança de 95% e teve como principal objetivo a comparação dos valores obtidos entre queijos experimentais referentes às duas tipologias de redução de sódio e, também, dos queijos experimentais com a amostra controlo.

3.2 Propriedades composicionais e físico-químicas

A influência da substituição de NaCl por KCl e redução simples de Na na composição química ao longo da maturação do queijo São João é apresentada na tabela 3.2. A ANOVA demonstrou que todas as variáveis dispostas, respeitantes à composição nutricional, resultaram significativamente diferentes ($P < 0,05$) ao longo da maturação, à exceção da matéria gorda. Ao longo da cura, os teores de humidade e proteína desceram enquanto o teor mineral (cinza) aumentou, para o mesmo tratamento de salga. Neste estudo, não se verificaram diferenças significativas ($P > 0,05$) na humidade, proteína e matéria gorda entre queijos controlo e queijos experimentais, para o mesmo período de maturação, com exceção do parâmetro proteico, no lote B, para os 8 dias de cura.

Tabela 3.2: Composição química do queijo São João salgado com NaCl ou misturas de NaCl/KCl ou KCl apenas, durante a maturação.

Lote	Maturação (dias)	T _{calor} ^A	Humidade (%) ^B	Proteína (%) ^B	Sal (%) ^{B,C}	S/H (%) ^B	Cinza (%) ^B	Gordura (%) ^B	Lactose (%) ^B
A	8	C	66,68 ± 1,03	40,49 ± 2,89	2,73 ± 0,03	4,09 ± 0,04	8,20 ± 0,11	52,45 ± 1,62	1,46 ± 0,04
		A1	68,40 ± 0,51	38,33 ± 1,11	2,33 ± 0,10	3,41 ± 0,01	7,84 ± 0,04	60,45 ± 2,03	1,68 ± 0,20
		B1	65,42 ± 3,95	35,18 ± 4,95	2,56 ± 0,08	3,92 ± 0,11	8,74 ± 0,05	49,87 ± 1,60	2,54 ± 0,39
		C1	69,00 ± 0,18	33,95 ± 2,32	2,44 ± 0,05	3,53 ± 0,08	9,19 ± 0,07	56,58 ± 1,77	2,30 ± 0,46
	17	C	56,30 ± 0,28	32,01 ± 1,54	3,03 ± 0,21	5,38 ± 0,34	7,32 ± 0,21	51,43 ± 0,24	n.d.
		A1	57,91 ± 0,41	34,57 ± 0,95	2,80 ± 0,01	4,84 ± 0,03	7,20 ± 0,08	50,22 ± 0,30	n.d.
		B1	56,48 ± 0,58	36,27 ± 1,64	3,05 ± 0,19	5,39 ± 0,28	7,83 ± 0,10	52,21 ± 0,02	1,54 ± 0,02
		C1	56,72 ± 1,14	34,35 ± 2,08	3,15 ± 0,05	5,55 ± 0,21	8,62 ± 0,10	51,67 ± 1,13	n.d.
	28	C	56,72 ± 1,14	34,75 ± 0,93	2,92 ± 0,19	6,86 ± 1,20	7,60 ± 0,01	44,47 ± 0,61	-
		A1	44,00 ± 0,59	36,59 ± 0,76	3,15 ± 0,23	7,17 ± 0,61	7,87 ± 0,35	41,40 ± 0,77	-
		B1	44,00 ± 0,59	35,52 ± 0,47	3,29 ± 0,18	7,39 ± 0,80	8,36 ± 0,07	44,70 ± 0,53	-
		C1	44,00 ± 0,59	35,68 ± 0,78	3,89 ± 0,09	8,05 ± 0,11	9,21 ± 0,41	50,42 ± 0,17	-
	40	C	34,97 ± 2,87	33,66 ± 1,71	2,76 ± 0,77	7,76 ± 1,57	8,57 ± 1,05	42,65 ± 0,98	-
		A1	34,97 ± 2,87	35,68 ± 0,31	3,41 ± 0,18	8,64 ± 0,15	8,69 ± 0,11	47,55 ± 1,22	-
		B1	38,64 ± 3,34	36,15 ± 0,47	3,51 ± 0,15	9,12 ± 0,41	9,32 ± 1,06	50,56 ± 1,50	-
		C1	38,64 ± 3,34	35,22 ± 0,30	3,95 ± 0,11	9,49 ± 0,03	10,20 ± 0,23	52,05 ± 0,38	-
B	8	C	58,38 ± 0,62	34,98 ± 0,37	2,19 ± 0,01	3,73 ± 0,03	6,33 ± 0,44	48,90 ± 0,58	2,01 ± 0,49
		A1	58,38 ± 0,62	34,78 ± 4,12	2,91 ± 0,01	5,85 ± 0,15	7,40 ± 0,34	46,00 ± 0,72	1,04 ± 0,19
		B1	53,10 ± 2,79	36,36 ± 0,38	2,51 ± 0,06	4,74 ± 0,36	7,36 ± 0,07	51,30 ± 1,43	n.d.
		C1	53,10 ± 2,79	34,86 ± 0,10	2,58 ± 0,12	4,60 ± 0,12	7,62 ± 0,39	48,01 ± 0,20	0,79 ± 0,02
	17	D1	53,10 ± 2,79	37,13 ± 0,20	2,33 ± 0,04	4,10 ± 0,07	7,34 ± 0,26	46,18 ± 0,59	2,25 ± 0,48
		C	53,55 ± 1,46	35,55 ± 2,37	2,79 ± 0,19	5,22 ± 0,49	7,05 ± 0,10	56,00 ± 0,30	n.d.
		A1	53,55 ± 1,46	35,85 ± 1,28	3,87 ± 0,17	7,89 ± 0,69	9,27 ± 0,11	57,39 ± 0,20	n.d.
		B1	53,55 ± 1,46	36,73 ± 1,58	3,02 ± 0,04	6,26 ± 0,32	8,85 ± 0,50	50,17 ± 1,63	n.d.
	28	C1	47,79 ± 1,18	36,54 ± 0,20	2,66 ± 0,07	5,56 ± 0,02	7,92 ± 0,18	41,15 ± 1,49	n.d.
		D1	47,79 ± 1,18	35,55 ± 0,00	2,59 ± 0,11	5,74 ± 0,34	7,84 ± 0,19	41,21 ± 1,69	n.d.
		C	47,79 ± 1,18	31,08 ± 1,85	2,78 ± 0,14	6,53 ± 0,46	7,68 ± 0,33	42,84 ± 0,89	-
		A1	47,79 ± 1,18	38,74 ± 0,23	3,91 ± 0,09	10,81 ± 1,24	9,54 ± 0,70	41,05 ± 0,45	-
C	17	B1	41,90 ± 11,44	39,74 ± 1,17	3,20 ± 0,12	7,62 ± 1,57	7,99 ± 0,14	47,95 ± 0,74	-
		C1	41,90 ± 11,44	40,03 ± 2,82	3,08 ± 0,05	6,51 ± 0,30	8,67 ± 1,07	50,68 ± 2,48	-
		D1	41,90 ± 11,44	42,57 ± 4,19	2,62 ± 0,13	7,73 ± 0,86	8,83 ± 0,75	39,77 ± 0,46	-
		C	41,90 ± 11,44	36,92 ± 3,21	3,04 ± 0,25	6,82 ± 0,43	9,85 ± 0,96	57,43 ± 1,53	-
	40	A1	37,57 ± 1,00	35,14 ± 1,04	5,04 ± 0,08	13,42 ± 0,14	11,95 ± 0,51	49,80 ± 1,91	-
		B1	37,57 ± 1,00	35,36 ± 0,10	4,05 ± 0,14	9,15 ± 0,20	11,69 ± 0,25	56,46 ± 0,87	-
		C1	37,57 ± 1,00	34,68 ± 0,39	3,75 ± 0,11	8,58 ± 0,25	11,11 ± 0,33	51,79 ± 0,51	-
		D1	37,57 ± 1,00	36,60 ± 3,29	3,32 ± 0,10	7,46 ± 0,26	11,10 ± 0,26	57,66 ± 1,60	-
	28	C	47,34 ± 2,99	32,55 ± 1,63	3,07 ± 0,24	6,54 ± 0,92	8,53 ± 0,34	44,10 ± 1,54	-
		A1	47,34 ± 2,99	31,74 ± 0,99	2,94 ± 0,03	5,89 ± 0,50	8,08 ± 0,36	51,78 ± 1,92	-
		B1	47,34 ± 2,99	34,33 ± 0,93	2,45 ± 0,03	4,84 ± 0,15	7,62 ± 0,27	48,29 ± 1,90	-
		C1	47,34 ± 2,99	33,65 ± 0,53	2,70 ± 0,12	5,52 ± 0,27	8,09 ± 0,17	52,69 ± 0,30	-
	40	D1	51,34 ± 2,90	31,51 ± 0,40	1,87 ± 0,22	3,62 ± 0,23	7,78 ± 0,14	48,86 ± 0,00	-

Tabela 3.2 (continuação): Composição química do queijo São João salgado com NaCl ou misturas de NaCl/KCl ou KCl apenas, durante a maturação.

Lote	Maturação (dias)	Tratamento da salga ^A	Humidade (%) ^B	Proteína (%) ^B	Sal (%) ^{B,C}	S/H (%) ^B	Cinza (%) ^B	Gordura (%) ^B	Lactose (%) ^B
A	8	A2	66,69 ± 0,12	39,93 ± 2,51	2,23 ± 0,24	3,34 ± 0,30	7,48 ± 0,26	56,27 ± 1,28	2,07 ± 0,23
		B2	65,86 ± 3,06	40,01 ± 0,89	1,99 ± 0,01	3,02 ± 0,15	6,91 ± 0,39	49,49 ± 1,42	1,77 ± 0,27
		C2	66,62 ± 0,04	39,31 ± 5,86	1,06 ± 0,05	1,60 ± 0,07	5,86 ± 0,07	57,97 ± 0,69	1,38 ± 0,38
	17	A2	56,85 ± 0,33	37,15 ± 3,46	2,96 ± 0,29	5,21 ± 0,49	7,22 ± 0,20	52,29 ± 0,02	n.d.
		B2	56,20 ± 1,37	38,67 ± 1,49	2,66 ± 0,16	4,73 ± 0,41	7,42 ± 0,37	56,20 ± 0,91	n.d.
		C2	52,92 ± 0,54	39,31 ± 2,68	1,80 ± 0,23	3,40 ± 0,48	5,73 ± 0,36	59,32 ± 2,94	n.d.
	28	A2	46,71 ± 0,47	37,07 ± 0,61	2,73 ± 0,22	5,84 ± 0,40	7,05 ± 0,32	46,82 ± 0,42	-
		B2	44,18 ± 0,69	37,43 ± 0,58	2,34 ± 0,08	5,29 ± 0,10	6,61 ± 0,28	43,39 ± 0,66	-
		C2	46,36 ± 1,07	37,47 ± 0,85	1,49 ± 0,10	3,21 ± 0,14	5,93 ± 0,35	50,07 ± 0,34	-
	40	A2	40,16 ± 3,06	35,53 ± 0,93	2,97 ± 0,11	7,46 ± 0,83	7,88 ± 0,25	56,55 ± 1,20	-
		B2	36,24 ± 2,95	36,02 ± 0,00	2,34 ± 0,18	6,47 ± 0,03	7,39 ± 0,20	50,54 ± 0,76	-
		C2	41,69 ± 1,51	36,85 ± 0,70	1,69 ± 0,00	4,05 ± 0,15	6,16 ± 0,02	45,92 ± 1,23	-
B	8	A2	56,60 ± 1,31	35,92 ± 0,57	2,48 ± 0,08	4,38 ± 0,04	6,99 ± 0,27	45,59 ± 1,14	n.d.
		B2	57,26 ± 0,01	36,50 ± 0,36	1,88 ± 0,03	3,28 ± 0,06	5,81 ± 0,11	47,20 ± 0,16	0,94 ± 0,07
		C2	54,31 ± 0,09	38,92 ± 0,21	0,92 ± 0,15	1,69 ± 0,28	5,34 ± 0,17	48,54 ± 0,47	0,76 ± 0,75
		D2	52,97 ± 1,60	40,05 ± 0,95	0,31 ± 0,05	0,58 ± 0,07	4,42 ± 0,00	45,26 ± 0,46	n.d.
	17	A2	48,80 ± 4,18	36,41 ± 0,46	2,66 ± 0,15	5,46 ± 0,17	7,57 ± 0,31	56,71 ± 1,31	n.d.
		B2	48,09 ± 2,22	36,49 ± 0,38	1,96 ± 0,05	4,08 ± 0,08	5,30 ± 1,23	47,10 ± 1,19	n.d.
		C2	46,12 ± 2,70	36,93 ± 1,97	0,99 ± 0,06	2,16 ± 0,01	5,65 ± 0,25	47,57 ± 1,35	n.d.
		D2	51,18 ± 0,48	37,72 ± 1,38	0,52 ± 0,01	1,02 ± 0,01	5,11 ± 0,33	55,07 ± 2,99	n.d.
	28	A2	35,98 ± 8,62	36,44 ± 1,28	2,95 ± 0,03	8,54 ± 1,93	7,74 ± 0,81	45,00 ± 0,59	-
		B2	34,76 ± 4,31	39,06 ± 2,24	1,80 ± 0,01	5,27 ± 0,67	5,89 ± 0,51	40,75 ± 1,99	-
		C2	32,31 ± 1,05	45,25 ± 0,53	0,84 ± 0,05	2,60 ± 0,08	5,39 ± 0,17	37,92 ± 0,93	-
		D2	36,93 ± 7,59	43,83 ± 3,90	0,44 ± 0,02	1,23 ± 0,20	4,85 ± 0,01	52,44 ± 2,53	-
	40	A2	44,59 ± 0,89	34,29 ± 0,78	3,87 ± 0,06	8,68 ± 0,31	9,84 ± 0,35	59,95 ± 1,75	-
		B2	44,72 ± 0,92	35,56 ± 0,68	2,92 ± 0,20	6,53 ± 0,30	8,14 ± 0,16	49,75 ± 1,02	-
		C2	45,26 ± 0,99	37,33 ± 0,96	1,10 ± 0,03	2,42 ± 0,02	6,92 ± 0,07	51,39 ± 0,04	-
		D2	44,64 ± 0,31	36,47 ± 2,65	0,59 ± 0,01	1,32 ± 0,04	5,32 ± 0,29	64,07 ± 1,28	-
C	17	A2	47,95 ± 6,86	31,14 ± 0,57	2,13 ± 0,01	4,53 ± 0,63	6,85 ± 0,14	55,88 ± 1,52	-
		B2	52,29 ± 1,07	36,58 ± 0,15	1,66 ± 0,04	3,17 ± 0,14	6,18 ± 0,00	51,47 ± 0,61	-
		C2	50,76 ± 0,63	29,42 ± 0,10	1,06 ± 0,15	2,10 ± 0,32	5,18 ± 0,03	51,04 ± 0,01	-
		D2	44,59 ± 2,44	35,58 ± 0,88	0,46 ± 0,03	1,04 ± 0,12	4,45 ± 0,15	62,05 ± 1,39	-

^A Tratamento da salga: C = 100% NaCl (controle); A1 = 3NaCl:1KCl (m/m); B1 = 1NaCl:1KCl (m/m); C1 = 1NaCl:3KCl (1:3) (m/m); D1 = 100% KCl; A2 = 75% NaCl; B2 = 50% NaCl; C2 = 25% NaCl; D2 = 0% NaCl.

^B Valores médios ± desvio padrão referentes a dois ensaios.

^C A medição refere-se ao teor de cloretos expressos como sal total.
n.d. não detectado.

De um modo geral, a humidade dos lotes A e B apresenta uma tendência decrescente ao longo da maturação, como seria de esperar, com exceção do lote B aos 40 dias, facto que poder-se-á dever às condições de temperatura durante o transporte dos queijos para o laboratório. À semelhança da humidade, a proteína revelou uma ligeira tendência descendente, por vezes significativa ($P < 0,05$), ao longo da cura, apesar de apresentar algumas oscilações, principalmente no lote B. A redução de sódio por substituição com cloreto de potássio, ou por redução simples gradual do sal não afetou significativamente a humidade e a proteína, esta última a partir dos 17 dias de cura, ao longo da maturação, pese embora, seja possível observar-se, no geral, um aumento do teor em humidade e uma diminuição do teor proteico ao longo das modalidades de queijos associadas à salga por mistura NaCl/KCl, bem como uma diminuição da humidade e um aumento da proteína nas modalidades de queijo associadas à redução simples gradual de sódio até aos 28 dias de cura.

Não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de humidade entre os queijos controlo e os queijos experimentais de mistura NaCl/KCl e de redução gradual isolada do sal para o mesmo período de maturação. Contudo, verificou-se que os queijos experimentais salgados com mistura NaCl/KCl apresentam níveis de humidade ligeiramente mais elevados comparativamente aos queijos de redução simples gradual até cerca de 4 semanas de cura (Figuras 3.1 e 3.2), devido à maior capacidade de retenção de água pela matriz proteica dos queijos salgados com adição gradual de KCl (Guinee & Fox, 2004), com exceção dos queijos salgados com mistura NaCl/KCl (1:3 e 1:1) aos 8 e 40 dias de cura. Esta tipologia de queijos exibiu uma estrutura mais porosa no seu interior à medida que a quantidade de KCl na mistura aumentou, o que resultou no inchamento da massa uma vez que os poros continham água livre ao longo da matriz (Guinee & Fox, 2004). Como consequência, os queijos salgados com mistura NaCl/KCl e KCl apenas revelaram um teor proteico inferior comparativamente às modalidades de ensaio associadas à redução gradual simples, principalmente nas duas primeiras semanas, provavelmente devido à maior dificuldade no esgotamento do soro inerente a estes queijos, ao longo da maturação (Martins, 2012). A partir dos 17 e 28 dias de cura, as modalidades de ensaio por substituição/redução de cloreto de sódio apresentaram valores de proteína mais próximos entre si devido à perda de humidade, por expulsão da água intermédia, nos queijos salgados com KCl, facto que resultou numa textura mais compacta (Ayyash *et al.*, 2011) observada nos queijos São João, por fusão da massa através de uniões mais coesas entre as moléculas de caseína motivadas pelo processo enzimático da proteólise (Sá & Barbosa, 1990).

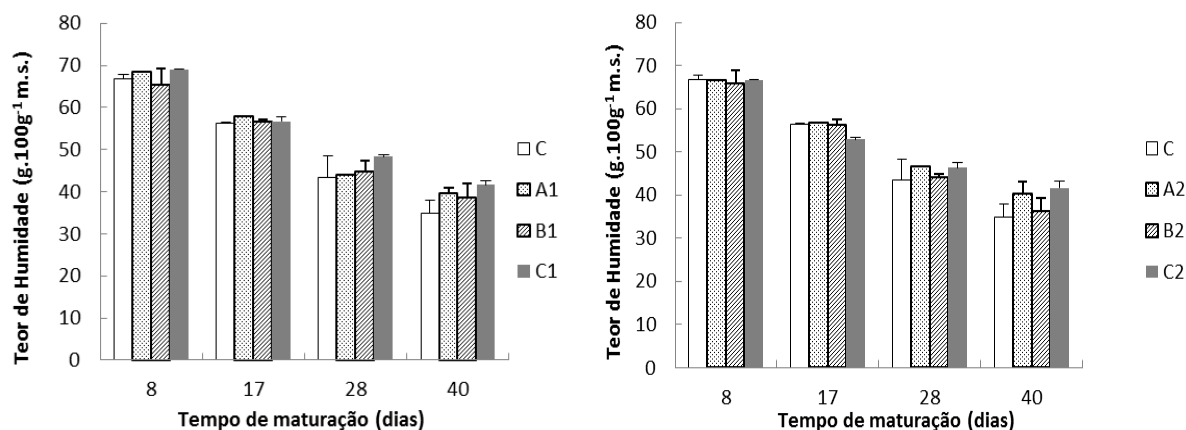


Figura 3.1 – Valores médios \pm desvio padrão de humidade obtidos no lote A relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

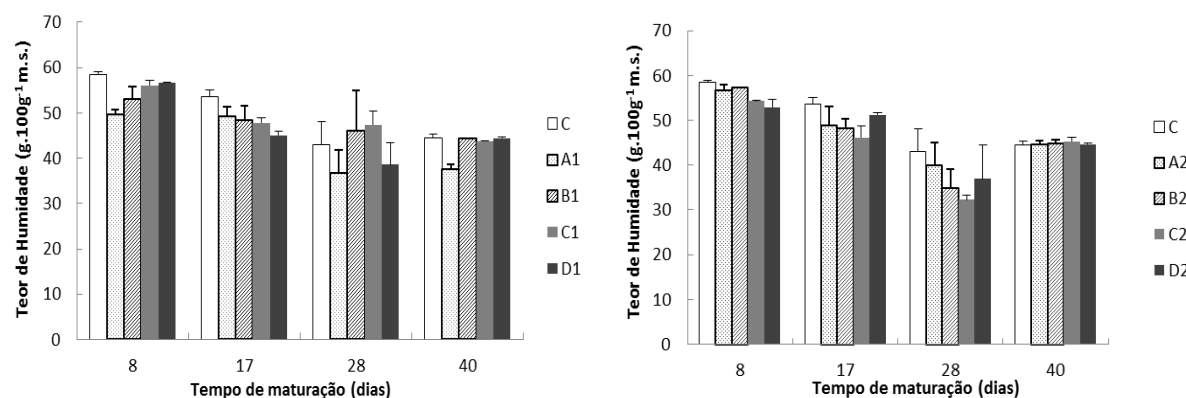


Figura 3.2 – Valores médios \pm desvio padrão de humidade obtidos no lote B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

A proteína aumenta ligeiramente ao longo das duas tipologias de redução de sódio (Figuras 3.3 e 3.4), seja por substituição ou por redução simples para cada dia de maturação analisado, com exceção do pequeno decréscimo não significativo observado na mistura (1:3) NaCl/KCl e do lote A, aos 8 dias de cura, devido provavelmente ao esgotamento de soro que terá ocorrido na primeira semana de maturação. Todos os queijos experimentais deste lote revelaram valores ligeiramente ($P>0,05$) mais elevados de proteína relativamente ao controlo apenas a partir dos 17 dias. Por analogia, no lote B, praticamente todos os queijos experimentais apresentaram valores superiores, por vezes de forma significativa ($P<0,05$), nos queijos com redução em sódio superior a 75%, comparativamente ao controlo até aos 28 dias de maturação. De acordo com o tratamento estatístico, verifica-se não haver diferenças significativas na utilização de cloreto de potássio como substituinte até 75% e na redução isolada de sal até 50% no teor da proteína no queijo. A redução isolada de NaCl exagerada, superior a 50%, pode retardar significativamente a degradação da proteína devido à desidratação significativa inerente a concentrações muito reduzidas de sal, por alterações na força iónica que ocorrem na matriz proteica do alimento (Ayyash *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2011; Guinee & Fox, 2004).

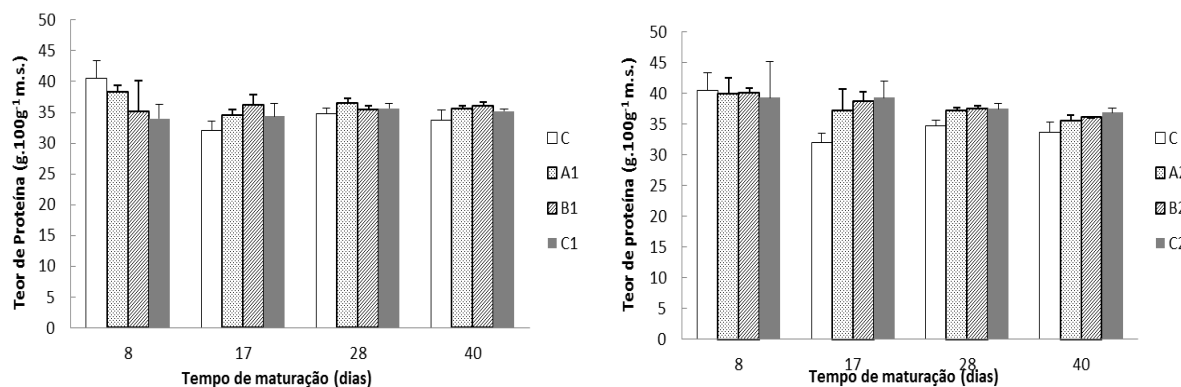


Figura 3.3 – Valores médios \pm desvio padrão de proteína obtidos no lote A relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

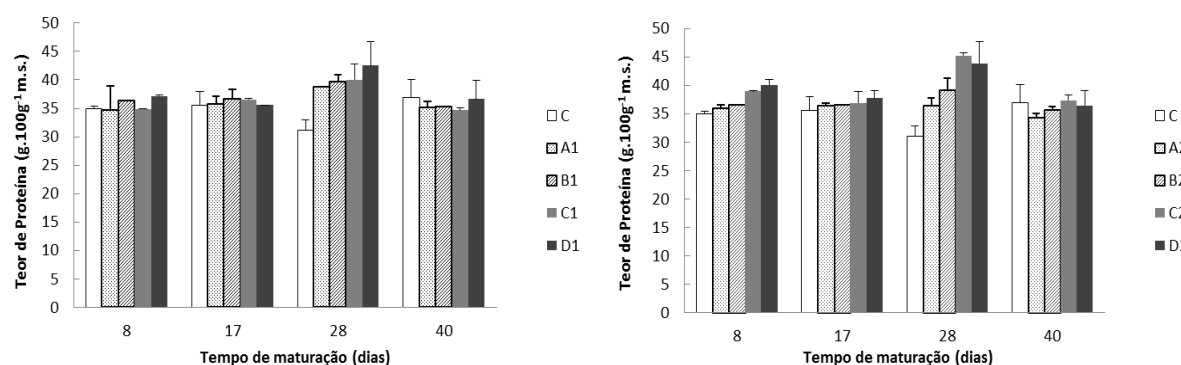


Figura 3.4 – Valores médios \pm desvio padrão de proteína obtidos no lote B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

Acresce ainda que se verificaram diferenças significativas entre lotes ($P < 0,05$) ao longo da maturação. O lote A apresentou uma humidade significativamente ($P < 0,05$) superior à dos lotes B e C, sugerindo uma prensagem insuficiente para o primeiro lote no fabrico. Por sua vez, os níveis de humidade dos lotes B e C são semelhantes entre si. Adicionalmente, no lote A, a humidade dos queijos experimentais revelou ser, na maioria das vezes, superior ao queijo controlo. Pelo contrário, no lote B, a humidade dos queijos experimentais revelou ser apenas ligeiramente inferior ao queijo controlo.

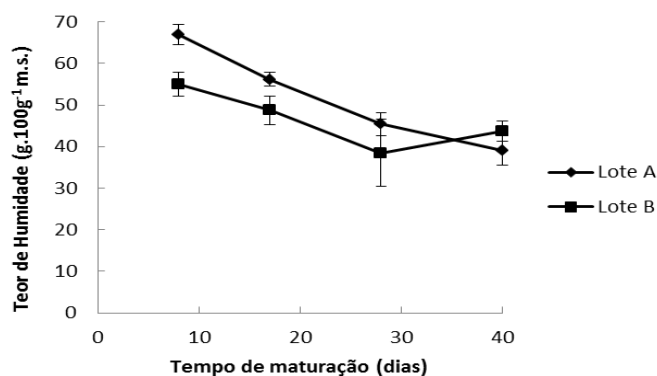


Figura 3.5 – Valores médios \pm desvio padrão de humidade obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.

No decurso da maturação, o teor de proteína oscila ($P<0,05$) ao longo da maturação no lote B, porém, verifica-se uma ligeira queda, do teor proteico ao longo tempo (Figura 3.6), em ambos os lotes, sendo mais visível no lote A ($P<0,05$). De notar um decréscimo significativo na proteína no lote B dos 28 aos 40 dias de cura. O lote C exibiu um menor teor proteico comparativamente aos lotes A e B ($P<0,05$), provavelmente devido à variação da composição química dos lotes de leite utilizado nos três fabricos, a qual se reflete no comportamento da matéria-prima ao longo do fabrico e que contribui para a composição química final do queijo.

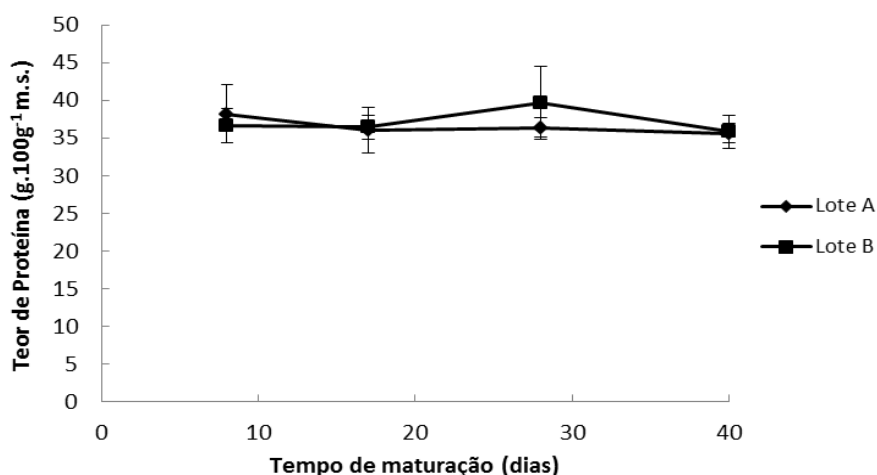


Figura 3.6 – Valores médios \pm desvio padrão de proteína obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.

Os teores de matéria gorda encontram-se dentro dos limites dispostos nas especificações da DOP para este queijo tradicional (45 a 60%, m/m), não revelando diferenças significativas entre os queijos controlo e os experimentais, à semelhança de estudos anteriores respeitantes à substituição parcial de NaCl por KCl para os queijos Halloumi (Ayyash *et al.*, 2011; Kamleh *et al.*, 2012), Feta (Katsiari *et al.*, 1997) e Kefalograviera (Katsiari *et al.*, 1998). Deste modo, os tratamentos de salga aplicados não influenciaram os níveis de gordura ao longo da maturação dos queijos. Os queijos do lote B apresentaram teores de gordura significativamente superiores ($P<0,05$) aos queijos dos outros lotes, provavelmente devido à composição química inicial da matéria-prima utilizado no fabrico visto ter sido detetada interação significativa ($P<0,05$) entre lotes de leite utilizados e dias de maturação.

Relativamente aos teores de cloretos e de cinza, verifica-se uma concentração do sal e do teor mineral ($P<0,05$) ao longo da maturação dos queijos para o mesmo tratamento de salga. Neste estudo, à medida que se aumentou a adição de cloreto de potássio verificou-se um aumento concomitante do teor de cinza, por vezes significativo ($P<0,05$), e, por analogia, ao reduzir gradualmente o sal de cloreto de sódio, também se verificou um decréscimo significativo ($P<0,05$) do teor de cinza no mesmo período de maturação.

Nos três lotes, para os teores de sal e de cinza não foram verificadas diferenças significativas entre queijos controlo e queijos respeitantes à redução dos níveis de sódio por substituição com cloreto de potássio. Os queijos salgados com mistura NaCl/KCl revelaram um conteúdo em cinzas superior aos

do queijo controlo e aos dos outros queijos experimentais, bem como uma concentração da cinza ao longo da maturação, relativo a cada tratamento de salga aplicado (Figuras 3.7 e 3.8). Estas observações estão em consonância com outros resultados obtidos, por Katsiari *et al.* (1997 e 1998) e Ayyash *et al.* (2010). De notar que, no lote B, foi observado que o teor de sal dos queijos com salga por substituição NaCl:KCl (3:1) era significativamente superior ao queijos de salga convencional ($P<0,05$), provavelmente devido à falta de padronização na aplicação manual do sal nos grãos da coalhada e respetiva homogeneização inicial (Cichoski *et al.*, 2002). Por sua vez, no que respeita aos queijos referentes à redução simples de cloreto de sódio, foram verificadas diferenças significativas nos teores de cloretos e de cinza ($P<0,05$) visto o sal ser gradualmente reduzido, à exceção da redução simples em 25% de sal no teor de cinza que não difere significativamente do queijo controlo. Em ambas as tipologias verifica-se o aumento ligeiro de sal e de cinza, inerente a cada modalidade, ao longo da maturação, apesar de ambos os teores diminuírem ao longo das modalidades, para cada dia de maturação analisado, devido à redução simples gradual de sal aplicada a esta tipologia de estudo.

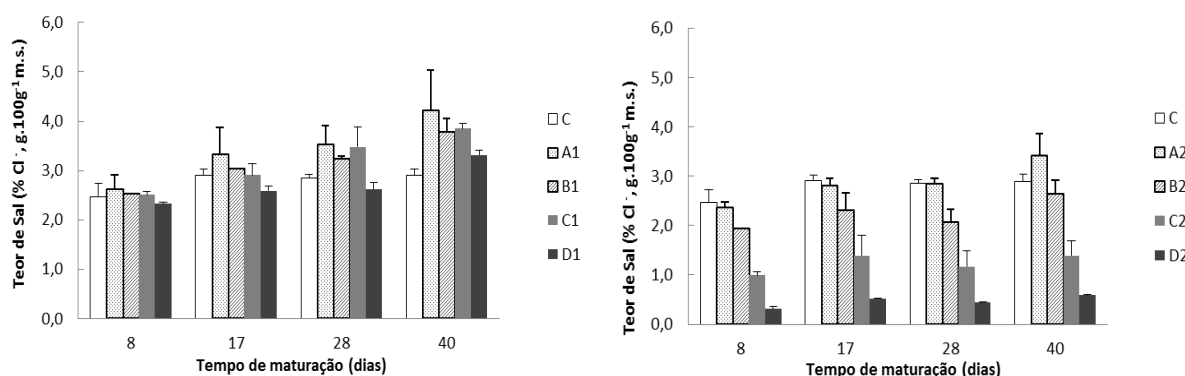


Figura 3.7 – Valores médios \pm desvio padrão de teor em sal obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

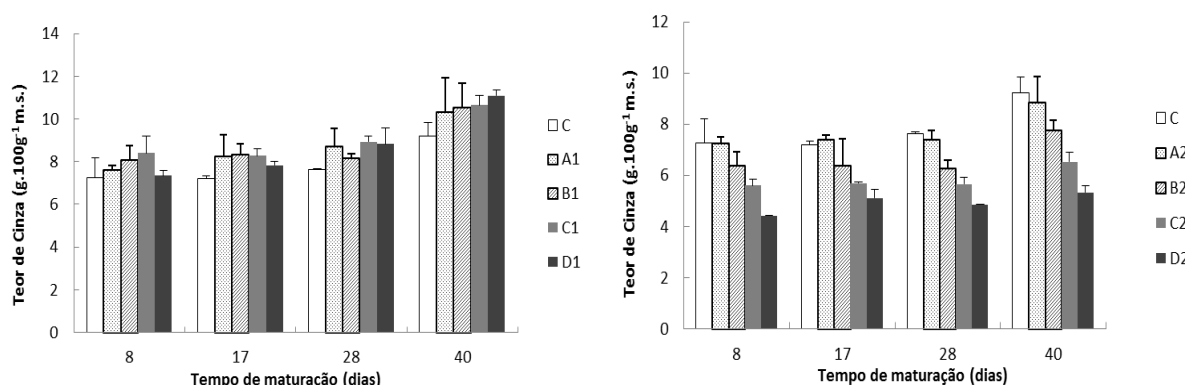


Figura 3.8 – Valores médios \pm desvio padrão de cinza obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

Em geral, verifica-se uma concentração de sal e de cinza ao longo da maturação dos queijos ($P<0,05$) até aos 17 dias de cura, mantendo-se posteriormente estável, com exceção do lote B, no intervalo de tempo respeitante aos 28 a 40 dias de cura (Figura 3.9). Acresce ainda que o lote A

revelou maior conteúdo mineral aos 8 dias e o lote B apresentou uma maior concentração de cinza aos 40 dias ($P<0,05$) (Figura 3.10).

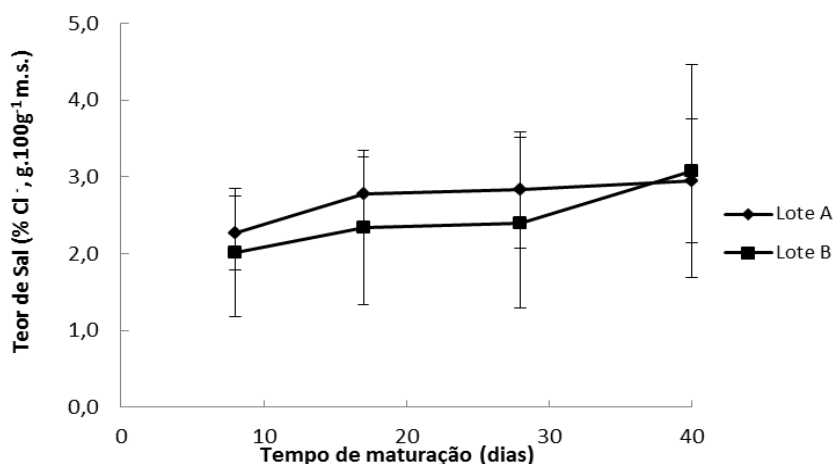


Figura 3.9 – Valores médios \pm desvio padrão do teor em sal obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.

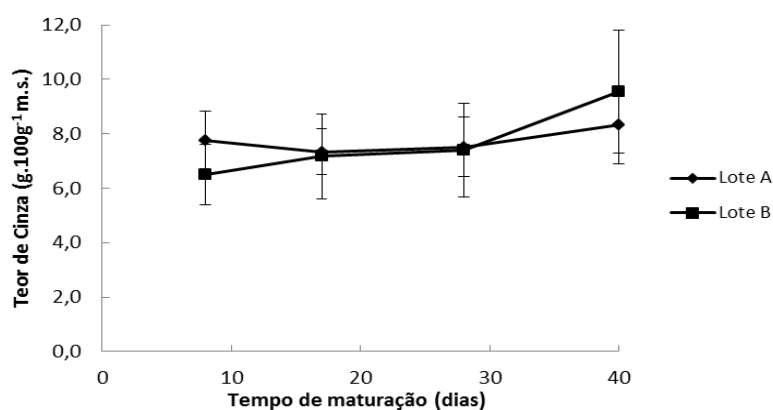


Figura 3.10 – Valores médios \pm desvio padrão de cinza obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.

Uma vez que a qualidade final do queijo pode ser condicionada pelo teor em sal na fase aquosa (rácio S/H) devido à sua influência nas bactérias lácticas, na atividade enzimática e, subsequentemente, no metabolismo bioquímico que ocorre durante o período de maturação no queijo (Cichoski *et al.*, 2002), foram determinados os valores para este parâmetro. Observou-se que, tal como no teor em sal do queijo, um decréscimo significativo ($P<0,05$) deste parâmetro com a desidratação proteica (Guinee & Fox, 2004) em função das modalidades associadas à redução isolada de sódio, pelo que permanece relativamente constante ao longo das modalidades de redução por substituição, embora apresentando uma ligeira tendência descendente associada a estas modalidades de salga nos lotes B e C, provavelmente devido à retenção de água pela matriz proteica (Guinee & Fox, 2004) dos queijos salgados com KCl, total ou parcialmente.

O teor de lactose do queijo tradicional de São João do Pico apresentou um decréscimo significativo ($P<0,05$) dos 8 aos 17 dias de maturação em ambos os lotes, o que poderá dever-se ao metabolismo da glicólise da lactose a ácido láctico, tendo-se registado um aumento significativo ($P<0,05$) da acidez ao longo da maturação, para o mesmo tratamento de salga nos lotes A e B, à semelhança do referido por Ayyash & Shah (2010), sendo o incremento da acidez mais acentuado ($P<0,05$) no período de 17 aos 28 dias de cura do lote B. Este fenómeno está relacionado com as bactérias lácteas constituintes dos fermentos, adicionados anteriormente à etapa de coagulação (Chichoscki *et al.*, 2002). De referir que aos 8 dias de maturação ainda se detetou lactose em todas as modalidades de ensaio. De um modo geral, o pH apresenta uma tendência decrescente ao longo da cura, inerente a cada modalidade de ensaio, sendo esta tendência mais definida para os queijos experimentais de redução gradual simples devido ao seu maior carácter ácido ao longo da cura.

De um modo geral, não se verificaram diferenças significativas nos níveis de lactose e de acidez entre os diferentes tipos de tratamento de salga aplicados, nas diversas fases de maturação registadas. Pelo contrário, verificaram-se diferenças significativas nos valores de pH ($P<0,05$) relativamente às modalidades de ensaio, nomeadamente nos lotes B e C. O efeito da substituição de NaCl por KCl e redução simples de Na nos valores médios dos parâmetros físico-químicos durante a maturação do queijo São João encontra-se apresentado na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Evolução dos parâmetros físico-químicos durante a maturação do queijo São João salgado com NaCl ou misturas de NaCl/KCl ou KCl.

Lote	Maturação (dias)	Tratamento da salga ^A	Acidez ^B (% ácido láctico)	pH ^B	a _w ^B	Tratamento da salga ^A	Acidez ^B (% ácido láctico)	pH ^B	a _w ^B
A	8	C	1,04 ± 0,02	5,29 ± 0,14	0,928 ± 0,001				
		A1	1,07 ± 0,12	5,19 ± 0,12	0,924 ± 0,001	A2	1,06 ± 0,04	5,32 ± 0,02	0,928 ± 0,001
		B1	0,98 ± 0,07	5,22 ± 0,05	0,927 ± 0,001	B2	1,14 ± 0,05	5,20 ± 0,09	0,927 ± 0,001
		C1	1,14 ± 0,16	5,30 ± 0,21	0,926 ± 0,001	C2	1,15 ± 0,09	5,19 ± 0,02	0,928 ± 0,001
	17	C	1,14 ± 0,06	5,48 ± 0,29	0,926 ± 0,000				
		A1	1,26 ± 0,04	5,28 ± 0,17	0,913 ± 0,005	A2	1,16 ± 0,00	5,18 ± 0,23	0,926 ± 0,002
		B1	1,08 ± 0,03	5,30 ± 0,24	0,920 ± 0,009	B2	1,17 ± 0,01	5,19 ± 0,16	0,913 ± 0,001
		C1	1,11 ± 0,01	5,28 ± 0,28	0,909 ± 0,003	C2	1,40 ± 0,00	5,20 ± 0,24	0,925 ± 0,001
	28	C	1,33 ± 0,01	5,00 ± 0,04	0,916 ± 0,002				
		A1	1,20 ± 0,00	4,97 ± 0,08	0,918 ± 0,004	A2	1,36 ± 0,03	4,91 ± 0,08	0,920 ± 0,004
		B1	1,23 ± 0,04	4,97 ± 0,02	0,921 ± 0,004	B2	1,43 ± 0,08	4,87 ± 0,02	0,909 ± 0,012
		C1	1,22 ± 0,09	4,87 ± 0,01	0,921 ± 0,004	C2	1,50 ± 0,01	4,83 ± 0,08	0,922 ± 0,003
	40	C	1,47 ± 0,01	5,04 ± 0,06	0,898 ± 0,011				
		A1	1,45 ± 0,08	5,12 ± 0,04	0,902 ± 0,005	A2	1,43 ± 0,09	5,41 ± 0,30	0,895 ± 0,007
		B1	1,51 ± 0,21	5,23 ± 0,14	0,906 ± 0,005	B2	1,64 ± 0,02	5,11 ± 0,08	0,900 ± 0,000
		C1	1,46 ± 0,02	5,08 ± 0,07	0,908 ± 0,003	C2	1,71 ± 0,12	4,91 ± 0,00	0,910 ± 0,003
B	8	C	0,85 ± 0,00	5,26 ± 0,00	0,906 ± 0,002				
		A1	0,46 ± 0,10	5,52 ± 0,16	0,904 ± 0,004	A2	0,56 ± 0,14	5,27 ± 0,15	0,913 ± 0,005
		B1	0,86 ± 0,06	5,51 ± 0,11	0,910 ± 0,000	B2	0,85 ± 0,03	4,99 ± 0,13	0,919 ± 0,006
		C1	0,76 ± 0,01	5,01 ± 0,12	0,911 ± 0,001	C2	0,91 ± 0,03	4,93 ± 0,07	0,912 ± 0,001
	17	D1	0,81 ± 0,00	5,11 ± 0,09	0,902 ± 0,004	D2	0,96 ± 0,10	5,00 ± 0,18	0,908 ± 0,008
		C	1,08 ± 0,06	5,15 ± 0,20	0,904 ± 0,003				
		A1	0,54 ± 0,16	5,65 ± 0,16	0,896 ± 0,000	A2	0,77 ± 0,11	5,30 ± 0,10	0,909 ± 0,002
		B1	0,38 ± 0,06	5,50 ± 0,24	0,907 ± 0,003	B2	0,86 ± 0,09	5,12 ± 0,12	0,899 ± 0,012
	28	C1	0,73 ± 0,04	5,33 ± 0,11	0,904 ± 0,003	C2	0,76 ± 0,16	5,41 ± 0,11	0,909 ± 0,002
		D1	1,00 ± 0,05	5,15 ± 0,16	0,894 ± 0,000	D2	0,88 ± 0,21	5,10 ± 0,06	0,902 ± 0,006
		C	1,18 ± 0,05	5,20 ± 0,04	0,893 ± 0,003				
		A1	0,69 ± 0,05	5,66 ± 0,12	0,891 ± 0,005	A2	0,86 ± 0,16	5,68 ± 0,20	0,896 ± 0,002
	28	B1	1,02 ± 0,07	5,50 ± 0,12	0,897 ± 0,002	B2	1,16 ± 0,00	5,00 ± 0,13	0,891 ± 0,006
		C1	0,96 ± 0,03	5,14 ± 0,09	0,886 ± 0,007	C2	1,13 ± 0,10	5,12 ± 0,05	0,889 ± 0,009
		D1	1,26 ± 0,04	4,91 ± 0,00	0,886 ± 0,007	D2	1,29 ± 0,01	4,85 ± 0,02	0,888 ± 0,005
	40	C	1,32 ± 0,12	5,04 ± 0,11	0,893 ± 0,003				
		A1	1,05 ± 0,16	5,58 ± 0,08	0,880 ± 0,006	A2	1,14 ± 0,20	5,41 ± 0,07	0,896 ± 0,002
		B1	0,64 ± 0,29	5,46 ± 0,00	0,897 ± 0,002	B2	1,35 ± 0,01	5,03 ± 0,19	0,891 ± 0,006
		C1	1,20 ± 0,11	5,10 ± 0,12	0,886 ± 0,007	C2	1,16 ± 0,10	5,05 ± 0,22	0,889 ± 0,009
		D1	1,17 ± 0,25	4,90 ± 0,18	0,886 ± 0,007	D2	0,71 ± 0,04	4,86 ± 0,06	0,888 ± 0,005

Tabela 3.3 (continuação): Evolução dos parâmetros físico-químicos durante a maturação do queijo São João salgado com NaCl ou misturas de NaCl/KCl ou KCl.

Lote	Maturação (dias)	Tratamento da salga ^A	Acidez ^B (% ácido láctico)	pH ^B	a _w ^B	Tratamento da salga ^A	Acidez ^B (% ácido láctico)	pH ^B	a _w ^B
C	17	C	0,77 ± 0,03	5,36 ± 0,05	-				
		A1	1,14 ± 0,00	4,94 ± 0,07	-	A2	1,12 ± 0,08	4,83 ± 0,02	-
		B1	1,21 ± 0,06	4,78 ± 0,03	-	B2	1,04 ± 0,04	4,91 ± 0,02	-
		C1	1,08 ± 0,08	4,75 ± 0,06	-	C2	1,21 ± 0,15	5,30 ± 0,14	-
		D1	1,12 ± 0,20	5,04 ± 0,11	-	D2	0,75 ± 0,14	5,40 ± 0,03	-

^A Tratamento da salga: C = 100% NaCl (controle); A1 = 3NaCl:1KCl (m/m); B1 = 1NaCl:1KCl (m/m); C1 = 1NaCl:3KCl (1:3) (m/m); D1 = 100% KCl; A2 = 75% NaCl; B2 = 50% NaCl; C2 = 25% NaCl; D2 = 0% NaCl.

^B Valores médios ± desvio padrão referentes a dois ensaios.

Os queijos de substituição parcial de NaCl por KCl exibiram valores médios de acidez inferiores ao queijo controlo e aos queijos experimentais de redução simples (Figura 3.11), sendo que ambas as tipologias de redução de Na apresentaram uma tendência ascendente ao longo das modalidades de ensaio, especialmente nos queijos de redução gradual simples que revelaram maior acidez que o controlo e os demais experimentais. Verificou-se um aumento de acidez ao longo da maturação inerente a cada tipo de tratamento de salga aplicado, de acordo com Ayyash & Shah (2010) para o queijo Halloumi, obtido a partir de leite de vaca pasteurizado, conservados em salmoura a 4°C. Uma vez que o ácido láctico é produzido pelas bactérias lácticas via metabolização da lactose (Ayyash & Shah, 2010), os queijos com salga por mistura NaCl/KCl apresentaram uma ligeira tendência de aumento ($P>0,05$) de acidez à medida que a substituição de NaCl por KCl aumentou para cada dia de maturação analisado, podendo dever-se ao aumento nas contagens das bactérias lácteas com o subsequente aumento na produção de ácido láctico, conforme reportado por Ayyash & Shah (2010) para o queijo Halloumi.

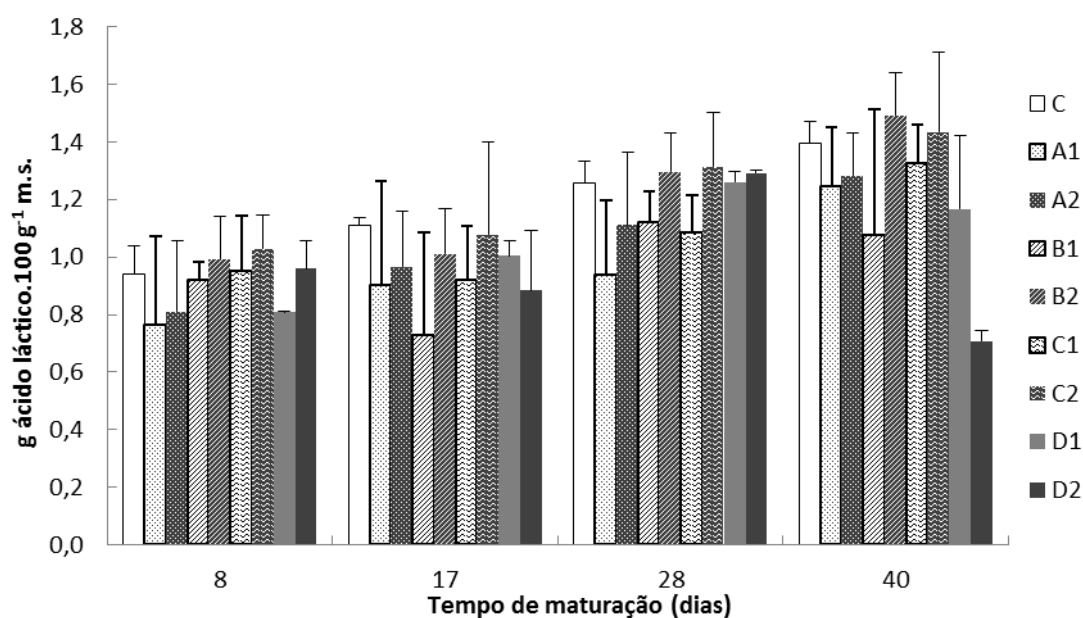


Figura 3.11 – Valores médios \pm desvio padrão da acidez obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

Relativamente ao pH (Figura 3.12), os queijos experimentais com salga por substituição com KCl revelaram, e em particular no lote B, uma tendência para valores médios de pH significativamente superiores ($P<0,05$) nos queijos salgados com mistura NaCl/KCl (3:1 e 1:1) comparativamente aos queijos experimentais de redução simples gradual do sódio e ao queijo controlo, de acordo com o obtido por Ayyash & Shah (2010) para o queijo Halloumi, apesar de não se ter verificado influências significativas do pH ao longo do tempo de cura. Contudo, observou-se que praticamente todos os queijos experimentais obtiveram valores de pH inferiores ao queijo controlo, especialmente os referentes à tipologia de redução simples gradual de Na, devido ao aumento da atividade microbiana e à sobreposição de protões relativamente ao sódio na ligação à caseína, resultando em queijos mais duros e quebradiços a partir da redução de 50% NaCl (Perry, 2004). Por analogia, observou-se que

os queijos de redução simples de Na aumentaram de acidez, de modo acentuado, à medida que o sal de cloreto de sódio diminuiu, provavelmente devido à sobreposição dos efeitos de hidratação sobre o de conservação, uma vez que, anteriormente se verificou uma diminuição do teor em sal na fase aquosa ao longo desta tipologia de queijos. De notar que os queijos experimentais totalmente isentos de sal sofreram um decréscimo significativo aos 40 dias de cura, provavelmente devido a erro experimental.

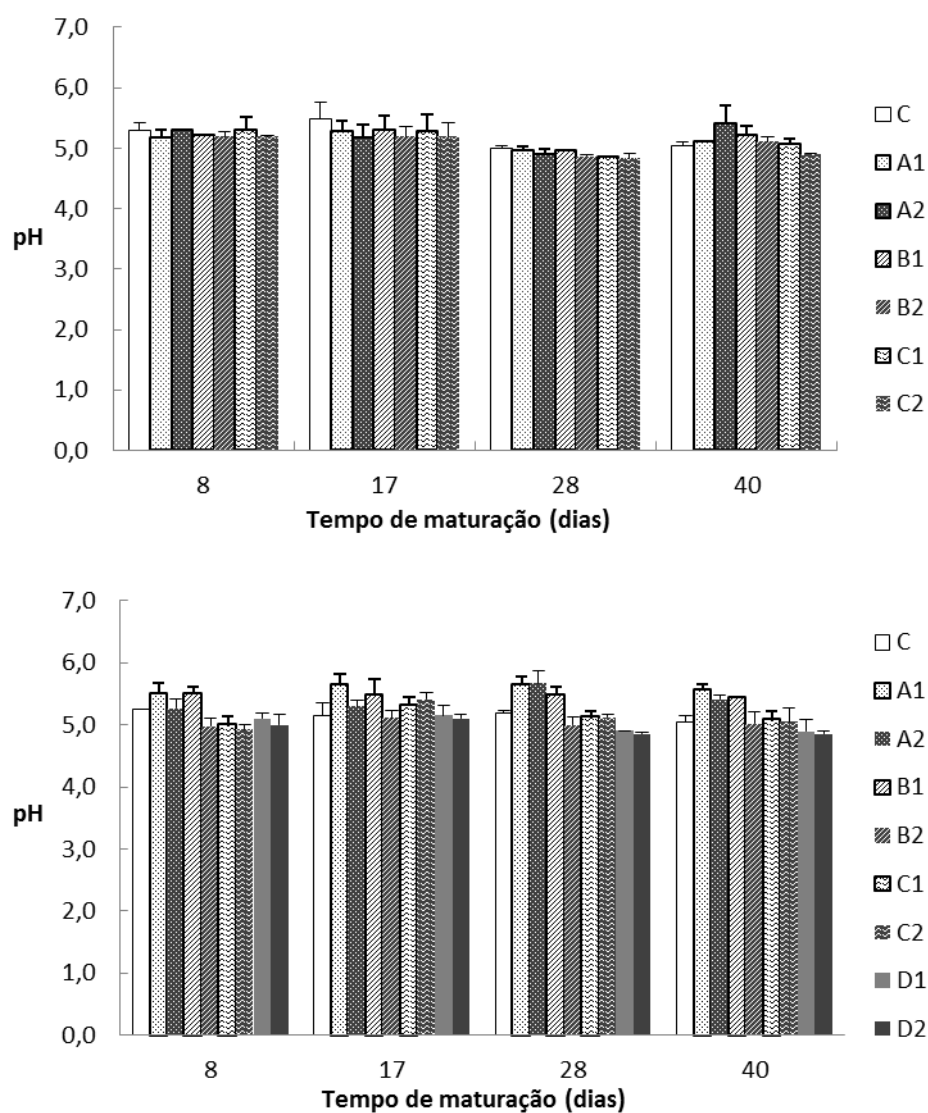


Figura 3.12 – Valores médios \pm desvio padrão de pH obtidos no lote A (em cima) e no lote B (em baixo) relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

O lote B revelou menor acidez e maior pH ($P<0,05$) comparativamente aos lotes A e C, que se revelaram mais ácidos.

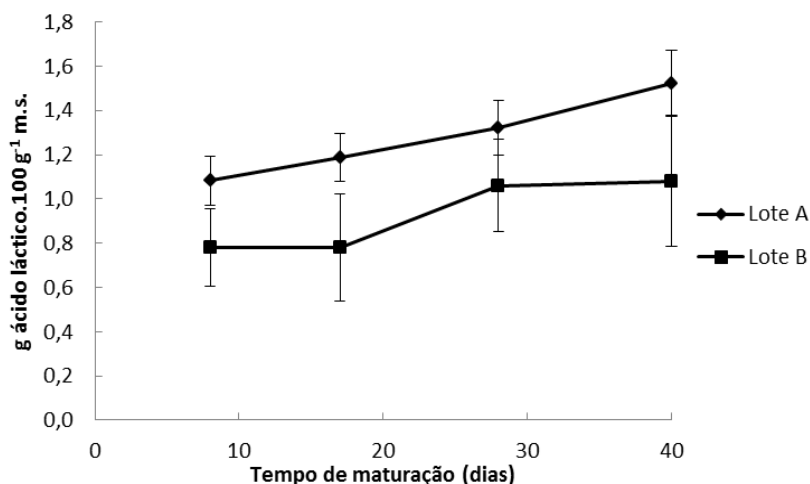


Figura 3.13 – Valores médios \pm desvio padrão da acidez obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.

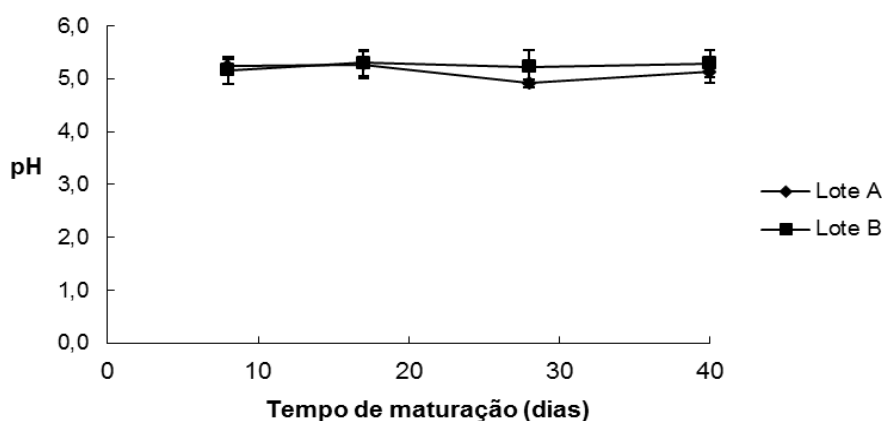


Figura 3.14 – Valores médios \pm desvio padrão do pH obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.

À semelhança dos parâmetros físico-químicos anteriores, os tratamentos de salga aplicados não influenciaram significativamente a atividade da água dos queijos, parâmetro físico-químico que revelou uma tendência decrescente ao longo da maturação ($P<0,05$) de acordo com outros estudos realizados por Katsiari *et al.* (1997 e 1998). Este decréscimo deve-se essencialmente à diminuição do teor em humidade, com a eventual contribuição da presença na matriz do queijo de compostos de baixo peso molecular, nomeadamente péptidos e aminoácidos, produzidos no decurso da maturação e que, segundo Katsiari *et al.*, (1997, 1998) podem estar associados à redução do a_w do queijo. Verifica-se também que o lote A apresenta uma atividade da água superior à do lote B ($P<0,05$).

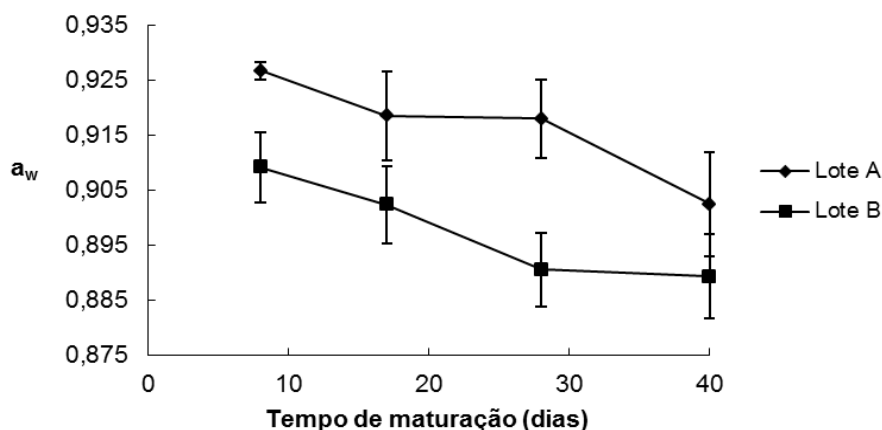


Figura 3.15 – Valores médios \pm desvio padrão da atividade da água obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.

Os dados dos elementos minerais, bem como os cálculos nutricionais relativos a Na e K nos queijos experimentais são dados pela tabela 3.4.

O teor em fósforo, no lote A, registou um decréscimo durante a maturação, essencialmente dos 8 aos 17 dias de cura ($P<0,05$). Por sua vez, no lote B, verificou-se um aumento da concentração de fósforo até aos 28 dias de cura, pelo que, a partir daí, decresceu acentuadamente ($P<0,05$). Contudo, no global, o fósforo apresentou uma ligeira diminuição ao longo da cura em ambos os lotes. Acresce ainda que o lote A revelou um menor conteúdo em fósforo ($P<0,05$) comparativamente aos lotes B e C, eventualmente devido ao teor proteico do primeiro lote que foi inferior ao lote B a partir dos 17 dias de cura, inclusive. Adicionalmente, pelo gráfico de comparação entre lotes A e B (Figura 3.16) observa-se uma evolução do fósforo análoga à evolução da proteína ao longo da maturação, podendo indicar que o fósforo mensurável corresponda maioritariamente ao fósforo ligado à micela caseínica, sob a forma de ião fosfato. Verifica-se também que o fósforo, no lote B, variou inversamente em função da humidade.

Tabela 3.4: Evolução do teor de mineral durante a maturação do queijo São João salgado com NaCl ou misturas de NaCl/KCl ou KCl apenas.

Lote	Maturação (dias)	Tratamento da salga ^A	Fósforo (%) ^B	Cálcio (mg.g ⁻¹) ^B	Magnésio (mg.g ⁻¹) ^B	Sódio (mg.g ⁻¹) ^B	Potássio (mg.g ⁻¹) ^B	Na/K ^C (base molecular)	mg Na.30g ⁻¹ queijo
A	8	C	0,90 ± 0,19	12,7 ± 1,1	0,53 ± 0,04	6,8 ± 0,7	4,1 ± 0,7	2,8 ± 0,1	204,2 ± 5,5
		A1	0,79 ± 0,14	13,9 ± 4,0	0,50 ± 0,04	5,1 ± 0,5	7,4 ± 1,8	1,2 ± 0,0	151,1 ± 8,9
		B1	0,81 ± 0,21	8,5 ± 3,4	0,49 ± 0,03	4,2 ± 0,5	12,2 ± 0,5	0,6 ± 0,1	123,9 ± 10,1
		C1	0,74 ± 0,06	9,7 ± 1,3	0,51 ± 0,09	3,4 ± 0,3	17,5 ± 0,8	0,3 ± 0,0	100,8 ± 0,6
	17	C	0,68 ± 0,10	8,4 ± 2,3	0,49 ± 0,08	8,9 ± 1,6	3,3 ± 0,4	4,6 ± 0,7	267,8 ± 39,6
		A1	0,64 ± 0,02	6,8 ± 0,4	0,58 ± 0,04	4,8 ± 0,5	7,3 ± 0,5	1,1 ± 0,0	144,3 ± 8,1
		B1	0,71 ± 0,03	8,4 ± 0,6	0,61 ± 0,02	4,2 ± 1,3	12,6 ± 1,1	0,6 ± 0,1	125,3 ± 24,3
		C1	0,64 ± 0,11	9,6 ± 3,4	0,60 ± 0,08	3,0 ± 0,2	16,2 ± 1,0	0,3 ± 0,0	89,4 ± 0,4
	28	C	0,71 ± 0,02	6,1 ± 3,3	0,60 ± 0,06	11,6 ± 0,5	2,8 ± 0,0	7,0 ± 0,2	349,0 ± 14,2
		A1	0,73 ± 0,01	6,2 ± 0,7	0,68 ± 0,02	12,8 ± 2,8	7,2 ± 0,4	3,1 ± 0,9	384,5 ± 84,2
		B1	0,70 ± 0,05	6,2 ± 1,0	0,67 ± 0,05	8,3 ± 0,1	11,4 ± 0,1	1,2 ± 0,0	249,7 ± 4,5
		C1	0,72 ± 0,01	7,2 ± 0,4	0,64 ± 0,03	5,6 ± 0,2	15,8 ± 1,0	0,6 ± 0,0	166,7 ± 6,0
	40	C	0,70 ± 0,01	7,3 ± 0,8	0,77 ± 0,07	12,8 ± 1,0	3,5 ± 0,2	6,2 ± 0,0	384,8 ± 30,2
		A1	0,75 ± 0,04	8,8 ± 0,5	0,47 ± 0,02	14,7 ± 1,8	8,5 ± 0,3	2,9 ± 0,2	441,4 ± 52,7
		B1	0,72 ± 0,02	6,9 ± 1,1	0,49 ± 0,02	8,4 ± 1,8	8,1 ± 0,0	1,8 ± 0,4	251,6 ± 54,7
		C1	0,64 ± 0,01	6,9 ± 0,1	0,70 ± 0,05	4,0 ± 1,3	11,0 ± 3,1	0,6 ± 0,0	118,6 ± 40,1
B	8	C	0,83 ± 0,13	8,4 ± 1,4	0,57 ± 0,13	9,7 ± 1,5	2,6 ± 0,4	6,2 ± 0,2	291,4 ± 46,0
		A1	0,73 ± 0,07	12,3 ± 0,6	0,55 ± 0,01	10,4 ± 0,4	6,9 ± 0,2	2,6 ± 0,2	311,9 ± 11,7
		B1	0,87 ± 0,01	10,8 ± 1,5	0,46 ± 0,08	5,9 ± 0,6	8,4 ± 0,4	1,2 ± 0,1	177,3 ± 17,0
		C1	0,86 ± 0,01	17,9 ± 8,8	0,24 ± 0,05	3,1 ± 1,2	11,1 ± 3,5	0,5 ± 0,0	94,4 ± 34,8
	17	D1	0,81 ± 0,00	11,6 ± 2,1	0,55 ± 0,02	1,0 ± 0,1	16,1 ± 0,9	0,1 ± 0,0	29,4 ± 3,4
		C	0,69 ± 0,13	8,8 ± 0,4	0,59 ± 0,03	11,8 ± 0,6	3,4 ± 0,3	6,0 ± 0,3	354,8 ± 16,5
		A1	0,67 ± 0,01	10,1 ± 0,8	0,56 ± 0,01	12,1 ± 0,0	8,4 ± 0,1	2,4 ± 0,0	363,7 ± 0,6
		B1	0,84 ± 0,02	8,8 ± 3,8	0,60 ± 0,02	8,4 ± 0,8	10,5 ± 0,8	1,4 ± 0,0	251,4 ± 25,0
	28	C1	0,85 ± 0,07	10,2 ± 1,1	0,58 ± 0,01	4,5 ± 0,1	11,5 ± 0,2	0,7 ± 0,0	134,5 ± 2,7
		D1	0,99 ± 0,02	12,6 ± 1,3	0,56 ± 0,00	1,2 ± 0,0	14,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	34,5 ± 0,5
		C	0,67 ± 0,04	10,5 ± 1,5	0,67 ± 0,05	11,7 ± 0,3	4,1 ± 0,6	4,9 ± 0,9	351,1 ± 8,4
		A1	0,83 ± 0,04	10,2 ± 0,6	0,61 ± 0,02	12,8 ± 0,6	8,5 ± 0,9	2,6 ± 0,1	382,5 ± 17,9
	40	B1	0,90 ± 0,01	9,0 ± 0,5	0,57 ± 0,03	7,9 ± 0,2	9,6 ± 0,2	1,4 ± 0,0	237,2 ± 6,3
		C1	0,77 ± 0,04	11,8 ± 0,9	0,64 ± 0,02	5,3 ± 0,9	12,8 ± 1,8	0,7 ± 0,0	158,1 ± 28,1
		D1	0,90 ± 0,13	10,0 ± 0,2	0,67 ± 0,03	1,3 ± 0,1	14,5 ± 0,2	0,2 ± 0,0	38,5 ± 3,9
		C	0,85 ± 0,01	7,8 ± 1,9	0,73 ± 0,03	14,0 ± 1,0	4,7 ± 0,2	5,0 ± 0,2	418,9 ± 31,3
C	17	A1	0,74 ± 0,04	10,9 ± 2,4	0,59 ± 0,01	14,5 ± 0,3	7,0 ± 0,4	3,5 ± 0,3	435,5 ± 9,4
		B1	0,70 ± 0,02	10,0 ± 0,1	0,74 ± 0,00	11,7 ± 0,1	10,8 ± 0,1	1,8 ± 0,0	350,6 ± 2,9
		C1	0,75 ± 0,01	7,0 ± 2,1	0,69 ± 0,17	5,3 ± 0,2	14,6 ± 0,6	0,6 ± 0,0	160,1 ± 6,1
		D1	0,84 ± 0,03	9,1 ± 0,0	0,80 ± 0,08	2,2 ± 0,4	20,6 ± 1,8	0,2 ± 0,0	64,5 ± 11,4
	28	C	0,79 ± 0,03	11,0 ± 1,4	0,60 ± 0,01	12,7 ± 0,1	3,6 ± 0,1	6,0 ± 0,1	382,4 ± 3,5
		A1	0,73 ± 0,02	9,9 ± 0,0	0,62 ± 0,00	10,2 ± 0,6	7,0 ± 0,6	2,5 ± 0,1	307,5 ± 18,3
		B1	0,75 ± 0,07	7,9 ± 0,7	0,56 ± 0,04	7,3 ± 0,3	10,0 ± 0,3	1,2 ± 0,0	217,7 ± 8,9
		C1	0,76 ± 0,01	11,3 ± 2,6	0,55 ± 0,02	5,3 ± 1,0	13,3 ± 1,4	0,7 ± 0,1	160,3 ± 29,1
		D1	0,77 ± 0,06	9,1 ± 0,2	0,49 ± 0,00	3,2 ± 0,9	15,3 ± 1,4	0,4 ± 0,1	97,3 ± 26,3

Tabela 3.4 (continuação): Evolução do teor de mineral durante a maturação do queijo São João salgado com NaCl ou misturas de NaCl/KCl ou KCl apenas.

Lote	Maturação (dias)	Tratamento da salga ^A	Fósforo (%) ^B	Cálcio (mg.g ⁻¹) ^B	Magnésio (mg.g ⁻¹) ^B	Sódio (mg.g ⁻¹) ^B	Potássio (mg.g ⁻¹) ^B	Na/K ^C (base molecular)	mg Na.30g ⁻¹ queijo
A	8	A2	0,84 ± 0,09	11,3 ± 5,0	0,51 ± 0,04	5,0 ± 0,6	3,4 ± 0,4	2,4 ± 0,1	147,9 ± 7,0
		B2	0,77 ± 0,03	10,5 ± 6,0	0,52 ± 0,07	4,1 ± 0,7	3,8 ± 0,5	1,8 ± 0,2	120,5 ± 8,4
		C2	0,74 ± 0,05	19,0 ± 8,1	0,59 ± 0,07	3,0 ± 0,1	4,4 ± 0,6	1,2 ± 0,0	91,5 ± 1,2
	17	A2	0,69 ± 0,07	6,8 ± 0,6	0,62 ± 0,03	8,6 ± 0,4	4,4 ± 1,4	3,2 ± 0,7	257,4 ± 11,3
		B2	0,74 ± 0,05	9,3 ± 0,8	0,64 ± 0,01	5,6 ± 0,9	4,4 ± 0,8	2,2 ± 0,4	167,8 ± 22,5
		C2	0,87 ± 0,07	10,0 ± 2,3	0,58 ± 0,05	3,3 ± 0,3	4,7 ± 0,9	1,2 ± 0,1	98,8 ± 5,2
	28	A2	0,67 ± 0,02	4,8 ± 0,4	0,58 ± 0,10	12,0 ± 2,2	2,7 ± 0,8	8,9 ± 4,2	361,1 ± 66,6
		B2	0,73 ± 0,02	6,2 ± 1,5	0,61 ± 0,01	9,3 ± 0,4	3,9 ± 0,0	4,0 ± 0,1	279,2 ± 11,1
		C2	0,82 ± 0,02	7,8 ± 1,2	0,70 ± 0,01	4,4 ± 0,2	4,0 ± 1,0	1,9 ± 0,0	131,5 ± 5,6
	40	A2	0,73 ± 0,02	8,4 ± 2,9	0,61 ± 0,02	6,0 ± 0,0	3,7 ± 0,3	2,8 ± 0,2	181,1 ± 0,0
		B2	0,75 ± 0,03	7,0 ± 0,9	0,50 ± 0,08	9,6 ± 3,3	3,1 ± 0,5	5,1 ± 0,9	286,8 ± 98,6
		C2	0,76 ± 0,04	11,7 ± 0,1	0,47 ± 0,01	7,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1	2,9 ± 0,0	209,2 ± 4,1
B	8	A2	0,85 ± 0,03	10,9 ± 1,4	0,63 ± 0,05	12,2 ± 0,4	5,0 ± 0,9	4,3 ± 0,9	366,1 ± 13,4
		B2	0,82 ± 0,03	19,4 ± 4,1	0,61 ± 0,08	6,7 ± 0,8	2,9 ± 0,5	4,0 ± 0,2	201,9 ± 24,7
		C2	0,91 ± 0,02	9,8 ± 0,4	0,65 ± 0,04	4,4 ± 0,2	3,9 ± 0,4	2,0 ± 0,3	132,6 ± 4,6
		D2	0,95 ± 0,01	15,8 ± 3,0	0,64 ± 0,01	0,9 ± 0,1	3,0 ± 0,3	0,5 ± 0,0	27,7 ± 1,7
	17	A2	0,83 ± 0,05	9,7 ± 0,4	0,62 ± 0,04	10,4 ± 1,2	3,1 ± 0,2	5,7 ± 0,4	312,6 ± 35,8
		B2	0,84 ± 0,02	8,5 ± 1,3	0,56 ± 0,05	7,5 ± 0,5	2,9 ± 0,1	4,4 ± 0,2	224,8 ± 15,2
		C2	0,96 ± 0,01	10,7 ± 1,1	0,66 ± 0,03	4,5 ± 0,6	3,0 ± 0,2	2,5 ± 0,2	134,4 ± 19,4
		D2	0,99 ± 0,12	12,1 ± 1,1	0,79 ± 0,13	1,6 ± 0,2	4,0 ± 0,6	0,7 ± 0,0	47,6 ± 4,6
	28	A2	0,82 ± 0,10	11,3 ± 1,8	0,63 ± 0,03	10,9 ± 2,2	3,8 ± 0,0	4,9 ± 0,9	327,1 ± 65,8
		B2	0,98 ± 0,29	9,6 ± 0,1	0,69 ± 0,00	7,8 ± 0,9	3,0 ± 0,0	4,4 ± 0,4	234,4 ± 25,7
		C2	1,13 ± 0,17	12,7 ± 3,1	0,57 ± 0,06	3,5 ± 0,5	2,6 ± 0,3	2,2 ± 0,1	104,4 ± 16,4
		D2	1,15 ± 0,08	9,2 ± 1,2	0,64 ± 0,01	1,5 ± 0,0	3,3 ± 0,0	0,8 ± 0,0	45,3 ± 0,1
	40	A2	0,75 ± 0,01	9,3 ± 0,7	0,75 ± 0,01	14,7 ± 0,3	4,8 ± 0,2	5,2 ± 0,1	440,9 ± 8,6
		B2	0,73 ± 0,01	10,0 ± 0,6	0,76 ± 0,01	9,3 ± 2,2	4,9 ± 0,1	3,3 ± 0,8	278,1 ± 67,1
		C2	0,82 ± 0,02	13,0 ± 0,4	0,84 ± 0,04	8,0 ± 1,0	4,9 ± 0,0	2,1 ± 0,3	238,8 ± 29,9
		D2	0,83 ± 0,00	9,1 ± 1,1	0,81 ± 0,09	1,8 ± 0,4	4,2 ± 0,7	0,7 ± 0,0	53,3 ± 11,4
C	17	A2	0,70 ± 0,00	9,5 ± 0,6	0,62 ± 0,01	9,3 ± 0,6	3,3 ± 0,2	4,8 ± 0,0	279,3 ± 17,6
		B2	0,86 ± 0,01	11,0 ± 0,0	0,58 ± 0,02	7,1 ± 0,6	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,1	213,6 ± 16,7
		C2	0,84 ± 0,02	6,9 ± 0,6	0,49 ± 0,03	5,4 ± 1,3	3,8 ± 0,0	1,5 ± 0,3	163,2 ± 38,1
		D2	0,94 ± 0,01	11,0 ± 4,3	0,57 ± 0,01	1,7 ± 0,5	4,8 ± 1,4	0,6 ± 0,0	52,0 ± 15,2

^A Tratamento da salga: C = 100% NaCl (controle); A1 = 3NaCl:1KCl (m/m); B1 = 1NaCl:1KCl (m/m); C1 = 1NaCl:3KCl (m/m); D1 = 100% KCl; A2 = 75% NaCl; B2 = 50% NaCl; C2 = 25% NaCl; D2 = 0% NaCl.

^B Valores médios ± desvio padrão referentes a dois ensaios.

^C Na / K (base molecular) = Na / K (base gravimétrica) x (39/23), visto que meq Na = mg Na/23 e meq K = mg K/39.

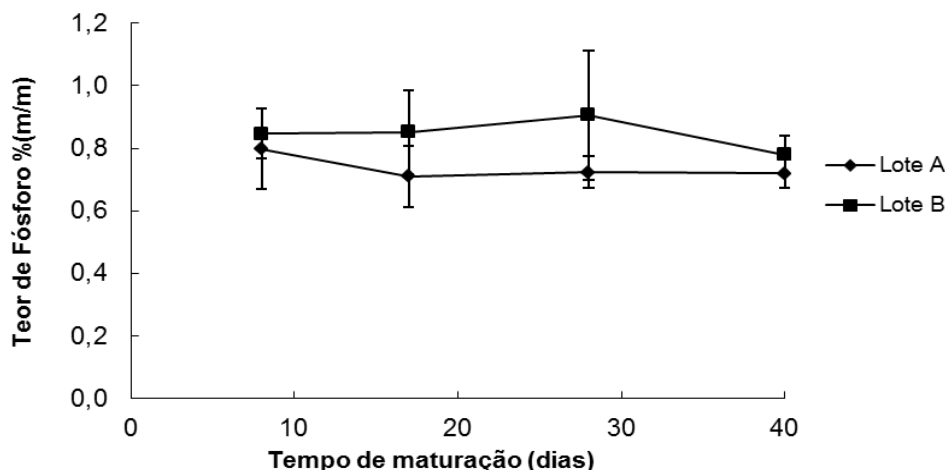


Figura 3.16 – Valores médios \pm desvio padrão de fósforo obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.

De um modo geral, não se verificaram efeitos significativos entre as modalidades de ensaio de substituição parcial do cloreto de sódio por cloreto de potássio na etapa da salga, nas diversas fases de maturação analisadas. Verificou-se que a redução dos níveis de sódio por substituição exibiu valores médios de fósforo ligeiramente inferiores nos queijos experimentais comparativamente ao queijo controlo e uma tendência ligeiramente crescente ao longo das modalidades de ensaio, para cada dia de maturação analisado até aos 28 dias. De notar que o queijo com NaCl totalmente substituído por cloreto de potássio (100% KCl) revelou maior teor de fósforo comparativamente aos queijos controlo a partir dos 17 dias de cura e consideravelmente superior aos demais queijos experimentais associados à mesma tipologia de salga. Estes efeitos poderão dever-se, provavelmente, a dois factores: 1) competição entre o ião K^+ e o ião Na^+ com o ião Ca^{2+} na ligação ao ião fosfato associado à molécula de *para*-caseína (Ayyash *et al.*, 2011), no qual se pode concluir que o potássio poderá ser tão eficaz como o sódio, em termos tecnológicos, quando presente em mistura NaCl/KCl na etapa da salga; 2) no queijo com 100% de KCl notou-se uma maior ineficácia da ligação do ião potássio ao ião fosfato. Cruz *et al.*, 2011 e Guinee & Fox, 2004 atribuem este efeito ao aumento do efeito estérico provocado pela nuvem electrónica do ião potássio, a qual é consideravelmente maior que a do ião sódio por este possuir um maior peso atómico, sendo a ligação iónica fosfato-Na mais estável que a ligação fosfato-K; inclusivamente, o sabor residual metálico atribuído ao anião fosfato foi perçecionado nestes queijos quando da avaliação sensorial (Cruz *et al.*, 2011).

As modalidades de ensaio inerentes à redução gradual simples de cloreto de sódio revelaram valores médios de fósforo significativamente superiores ao queijo controlo, essencialmente no queijo sem sal ($P < 0,05$), apresentando uma tendência crescente ao longo destas modalidades de ensaio para cada dia de maturação analisado (Figura 3.17). Este fenómeno pode ser explicado pela ausência do ião Na^+ para ligação iónica ao ião PO_4^{2-} associado à *para*-caseína, que provoca um decréscimo significativo da solubilidade proteica, e pelo processo de desmineralização da molécula de caseína

que ocorre por aumento da acidez, originando uma maior quantidade de fósforo livre total na matriz destes queijos experimentais (Cruz *et al.*, 2011; Sá & Barbosa, 1990). Em suma, verificou-se que quanto maior o teor de sódio na matriz do queijo menos fósforo livre fica disponível no queijo.

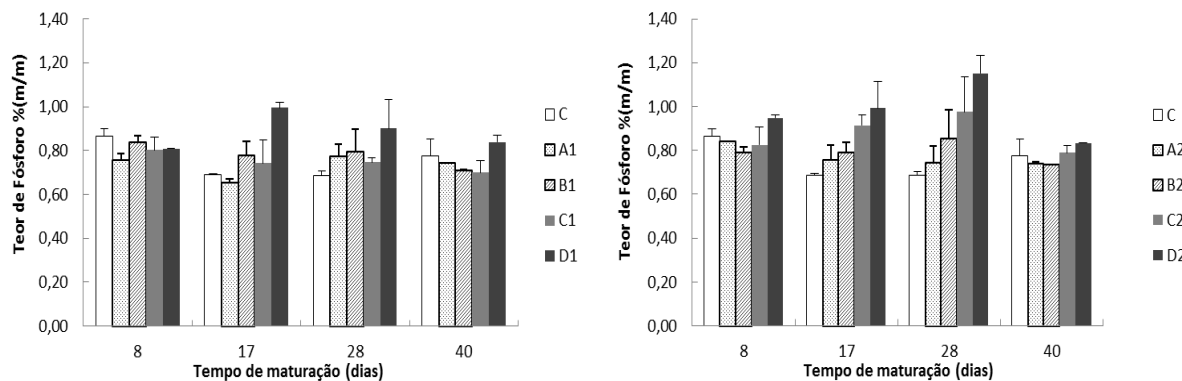


Figura 3.17 – Valores médios \pm desvio padrão de fósforo obtidos nos lotes A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

O teor de cálcio diminui ao longo da maturação ($P < 0,05$) devido ao processo da desmineralização (Figura 3.18). Pelo contrário, a concentração de magnésio apresenta uma tendência ascendente no lote B, ao longo do tempo, e no lote A, até aos 28 dias de cura ($P < 0,05$).

Contudo, foi observado (Figura 3.19) um aumento do teor de cálcio com a redução de sal, fundamentalmente aos 17 dias de cura, provavelmente devido a uma menor desmineralização do ião Ca^{2+} (Rulikowska *et al.*, 2013). Uma provável explicação será uma maior incapacidade do ião K^+ , devido à sua maior nuvem electrónica, em permutar com o ião Ca^{2+} para a ligação ao oxoanião (O^{2-}) do grupo fosfato associado à molécula caseínica (Guinee & Fox, 2004), no caso da tipologia de salga por substituição, sendo que na redução isolada do sal, esta provavelmente implica um aumento da escassez de trocas iónicas entre Na^+ e Ca^{2+} ao oxoanião do grupo fosfato devido às menores concentrações existentes do primeiro catião ao avançar nas modalidades de ensaio relativa a esta tipologia de salga (Rulikowska *et al.*, 2013). De um modo geral, não se registaram diferenças significativas entre modalidades de ensaio, sendo os valores médios de cálcio e magnésio similares em todos os queijos experimentais, apesar de se verificar um decréscimo de cálcio e um aumento de magnésio até aos 28 dias, inerente a cada modalidade, ao longo da maturação (Figura 3.19).

As tendências observadas relativamente aos teores de Na e K, nos lotes A e B, revelaram um incremento na concentração de Na no decurso da maturação, inerente a cada tratamento de salga aplicado, sendo este significativo ($P < 0,05$) apenas no lote A, e um ligeiro decréscimo de K no lote A ($P > 0,05$) e um aumento ténue de K no lote B ($P > 0,05$), ao longo da maturação. As tendências reveladas pelos teores de Na e K devem-se, fundamentalmente, ao tipo de salga aplicado no fabrico dos queijos. É notório o decréscimo ($P < 0,05$) de sódio ao longo das modalidades de ensaio, seja por substituição por KCl como por redução simples gradual do NaCl, para cada dia de maturação

analisado (Figura 3.20). Os teores de potássio nos queijos salgados com mistura NaCl/KCl foram significativamente mais elevados ($P<0,05$) comparativamente aos queijos controlo e de redução simples de Na, o que resulta do teor superior de KCl gradualmente adicionado na mistura NaCl/KCl na salga desta tipologia de queijos (Figura 3.21).

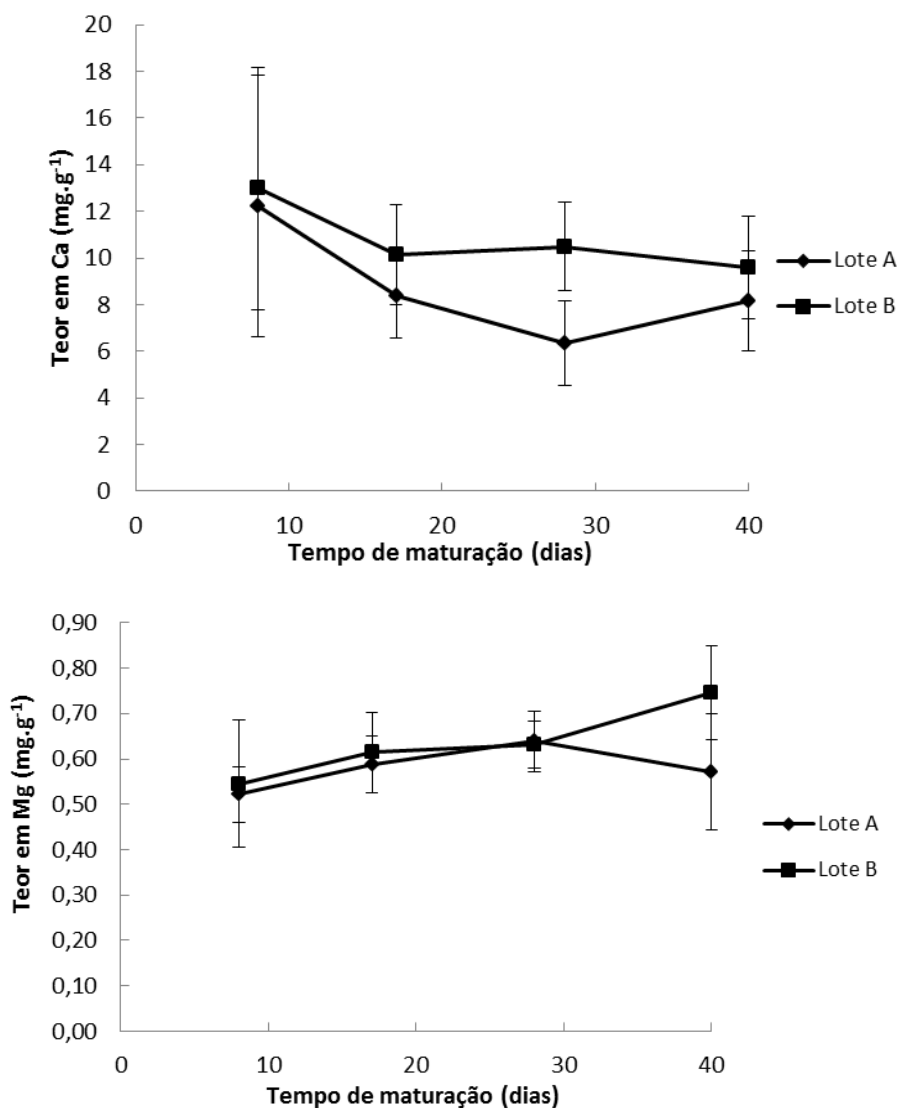


Figura 3.18 – Valores médios \pm desvio padrão de cálcio e magnésio obtidos nos lotes A e B ao longo da maturação.

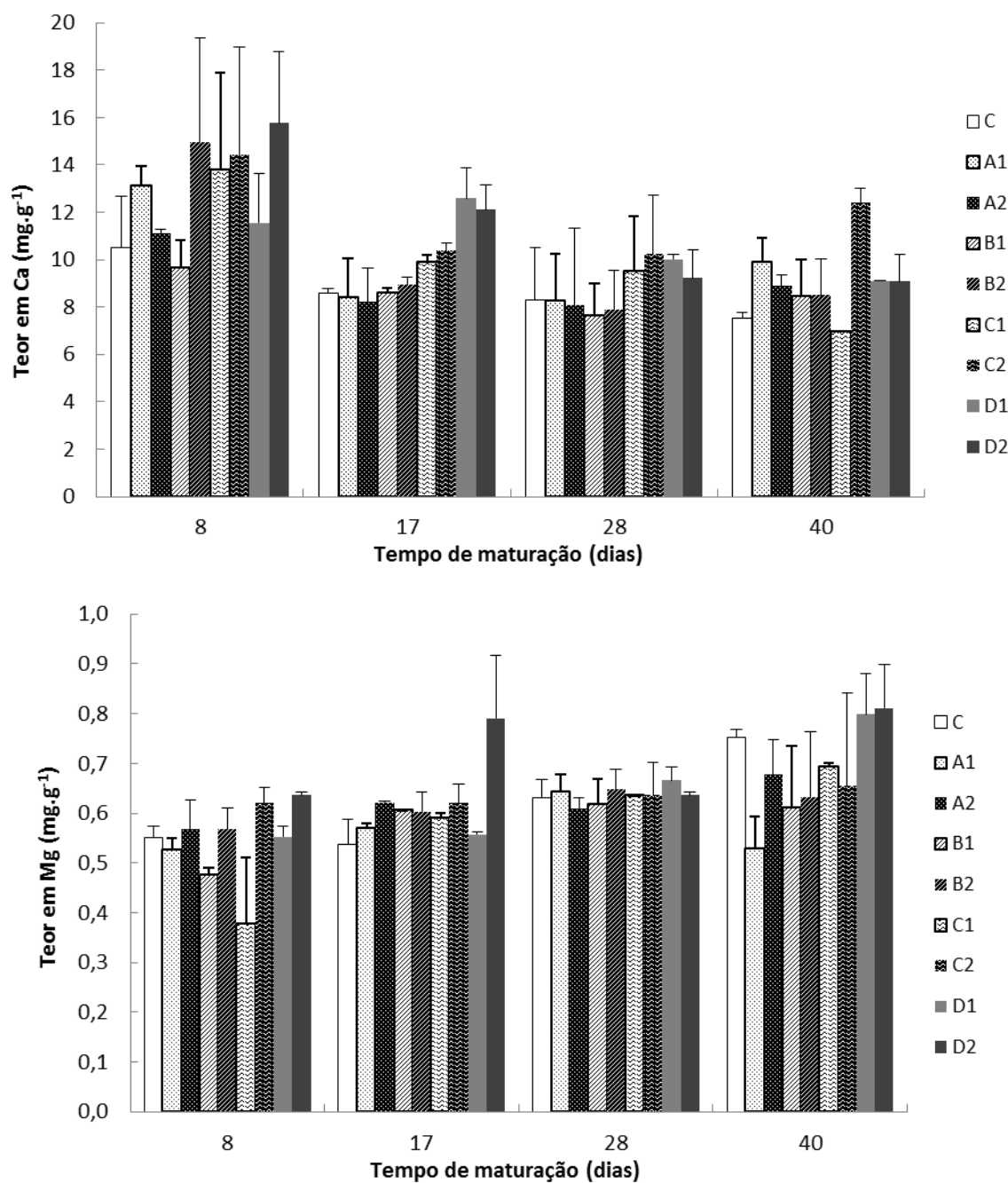


Figura 3.19 – Valores médios \pm desvio padrão de cálcio (em cima) e magnésio (em baixo) obtidos nos lotes A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

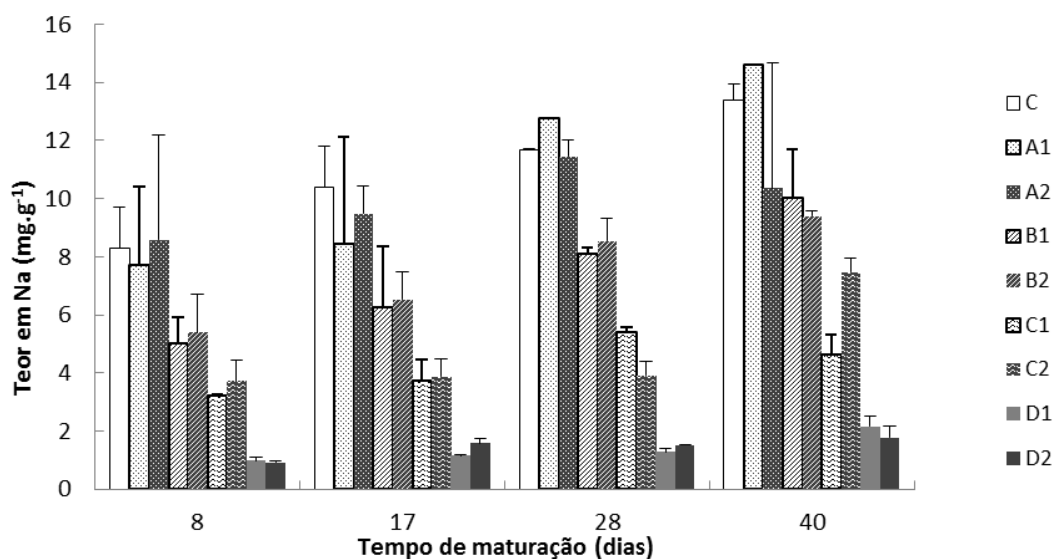


Figura 3.20 – Valores médios \pm desvio padrão de sódio obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

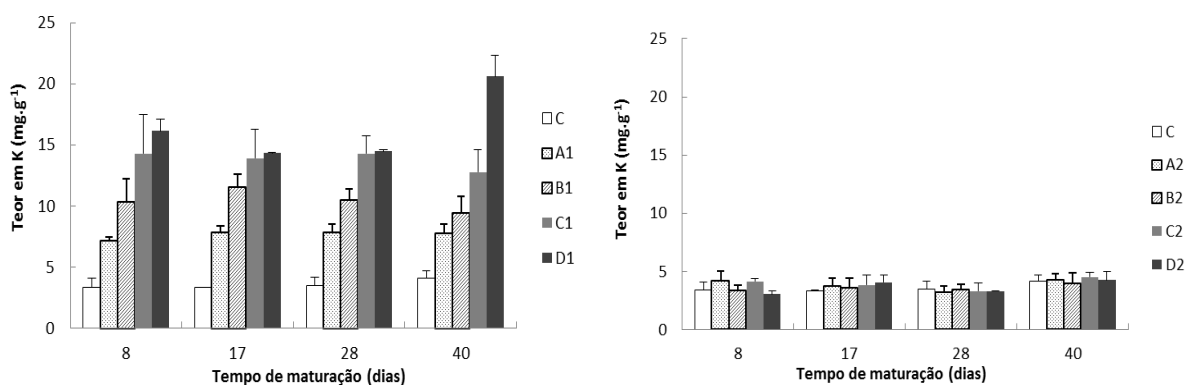


Figura 3.21 – Valores médios \pm desvio padrão de potássio obtidos nos lote A e B relativos aos tratamentos da salga utilizados ao longo da maturação.

A proporção Na/K indicada para um indivíduo adulto é de 0,6, numa base gravimétrica, o que corresponde a 1,0 em base molecular (Cruz *et al.*, 2011; Katsiari *et al.*, 1997, 1998). Como pode ser visualizado na tabela 3.4, a utilização de misturas NaCl/KCl (3:1, 1:1 e 1:3) reduzem efetivamente o rácio Na/K no queijo São João para 2,4, 1,3 e 0,7 (base molecular), respetivamente, aos 17 dias de maturação à medida que o sódio diminui e o potássio aumenta em comparação com a amostra padrão. Assim, os queijos salgados com misturas NaCl/KCl (1:1) e (1:3) obtiveram um rácio Na/K aceitável no primeiro caso e bastante satisfatório no segundo. Estes queijos tiveram um teor de Na, em média, de 251,4 e de 134,5 mg de sódio por porção de 30g de queijo, respetivamente, o que equivale a quantidades de 838,0 e de 448,2 mg de sódio por 100 g de queijo, sendo que não podem ser rotulados como alimento de “baixo teor em sódio” uma vez que não satisfazem o requisito de um

teor não superior a 120 mg por 100 g de alimento, de acordo com o disposto na retificação ao regulamento comunitário n.º 1924/2006 de 20 de dezembro, publicado em 2007. De notar que nas considerações feitas anteriormente não foi contabilizado o lote A por este possuir uma maior quantidade de água, o que influi nos resultados até aos 17 dias de cura inclusive. O queijo com redução simples de sódio em 25% pode ser rotulado como alimento de “teor reduzido em sódio” à semelhança dos anteriores. Os queijos experimentais salgados totalmente com KCl podem ser rotulados como alimento de “baixo teor em sódio”, porquanto conterem 115,2 mg de sódio por 100 g de queijo.

3.3 Microbiologia

Tabela 3.5: Determinações microbiológicas do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.

Lotes	Microorganismo	Tratamento da salga ^A	Log ufc.g ⁻¹ queijo ^B	Tratamento da salga ^A	Log ufc.g ⁻¹ queijo ^B
A	Totais viáveis	C	6,85 ± 0,34		
		A1	8,35 ± 0,43	A2	8,78 ± 0,01
		B1	7,92 ± 0,01	B2	7,71 ± 0,10
		C1	7,96 ± 0,54	C2	7,94 ± 0,06
	<i>Enterobacteriaceae</i>	C	4,15 ± 0,08		
		A1	4,07 ± 0,14	A2	3,96 ± 0,10
		B1	4,00 ± 0,09	B2	4,06 ± 0,29
		C1	4,34 ± 0,02	C2	2,45 ± 0,15
	<i>Staphylococcus</i>	C			
		A1	<1,0	A2	
		B1		B2	<1,0
		C1		C2	
	Bolors e Leveduras	C	2,22 ± 0,00		
		A1	1,85 ± 0,00	A2	2,12 ± 0,00
		B1	<1,0	B2	<1,0
		C1	1,98 ± 0,00	C2	2,12 ± 0,00
B	Totais viáveis	C	7,80 ± 0,27		
		A1	8,50 ± 0,48	A2	7,37 ± 0,05
		B1	8,58 ± 0,32	B2	7,48 ± 0,08
		C1	7,53 ± 0,09	C2	7,70 ± 0,01
	<i>Enterobacteriaceae</i>	D1	7,35 ± 0,16	D2	7,43 ± 0,12
		C	5,12 ± 0,35		
		A1	5,63 ± 0,36	A2	3,98 ± 0,55
		B1	4,75 ± 0,02	B2	4,22 ± 0,50
		C1	4,46 ± 0,15	C2	4,88 ± 0,28
	<i>Staphylococcus</i>	D1	4,33 ± 0,02	D2	4,15 ± 0,39
		C	1,96 ± 0,19		
		A1	<1,0	A2	<1,0
		B1	<1,0	B2	1,10 ± 0,12
		C1	1,56 ± 0,23	C2	<1,0
	Bolors e Leveduras	D1	1,01 ± 0,27	D2	<1,0
		C	2,51 ± 0,35		
		A1	2,56 ± 0,28	A2	1,96 ± 0,34
		B1	3,20 ± 0,00	B2	1,95 ± 0,26
		C1	<1,0	C2	2,00 ± 0,07
		D1	1,35 ± 0,00	D2	2,25 ± 0,69

^A Tratamento da salga: C = 100% NaCl (controlo); A1 = 3NaCl:1KCl (m/m); B1 = 1NaCl:1KCl (m/m); C1 = 1NaCl:3KCl (m/m); D1 = 100% KCl; A2 = 75% NaCl; B2 = 50% NaCl; C2 = 25% NaCl; D2 = 0% NaCl.

^B Valores médios ± desvio padrão referentes a dois ensaios.

Foram determinadas contagens de bactérias totais aeróbias mesófilas, enterobacteriáceas, estafilococos coagulase positivos e de bolors e leveduras por contagem em placa aos 17 dias de

maturação do queijo São João feito com leite pasteurizado (Tabela 3.5). As amostras também foram analisadas para detecção da presença de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

Uma vez que as contagens de germes totais devem corresponder maioritariamente a bactérias do ácido láctico, pelo facto do leite utilizado no fabrico de queijo ter sido submetido a um tratamento térmico prévio com adição posterior de fermento láctico, obteve-se elevada carga de germes totais nos queijos controlo e experimentais não tendo sido encontradas diferenças significativas entre os diversos tipos de tratamento de salga aplicados com a salga convencional. Contudo, as contagens dos totais viáveis aumentaram com a redução da concentração em NaCl, sendo mais elevadas nos queijos experimentais, à semelhança do obtido por Ayyash e Shah (2010) para os queijos Halloumi salgados com mistura NaCl/KCl até (1:3). De um modo geral, os queijos salgados com mistura NaCl/KCl exibem contagens de totais viáveis superiores aos queijos de redução gradual isolada de NaCl, pelo menos até 50% de substituição, correspondendo à maior capacidade de retenção de água pela matriz do queijo. A partir daí, verifica-se o inverso em que o efeito de conservação do sal é reduzido com a sua diminuição excessiva nos queijos de redução gradual simples, apesar do efeito de desidratação ser nítido nos queijos com 25 e 0% NaCl.

Em ambos os lotes, verificou-se que os valores das contagens de *Enterobacteriaceae* nos queijos controlo e experimentais excederam os limites. De um modo geral, os queijos de salga por mistura exibiram maiores contagens de enterobacteriáceas comparativamente aos queijos com redução simples em NaCl ($P>0,05$), sendo esta diferença significativa ($P<0,05$) na redução de 75% NaCl para o lote A, o que confirma o aumento da carga da flora microbiana entérica com o efeito de capacidade de retenção de água. Os queijos do lote B obtiveram valores significativamente mais elevados ($P<0,05$) nas contagens de enterobacteriáceas comparativamente ao lote A, podendo concluir-se que as fontes de contaminação, como por exemplo, falhas de higiene da superfície dos equipamentos em contacto com o alimento e/ou das mãos dos manipuladores, poderão ser cruciais para a contaminação no fabrico por esta família de bactérias, apesar da flora microbiana láctea poder restringir o desenvolvimento de outros microrganismos (Carvalho *et al.*, 2007).

De um modo geral, os resultados obtidos para as estirpes de estafilococos coagulase positivos foram aceitáveis, não tendo sido detetados nenhum no lote A, sendo que foi detetada a sua presença em alguns queijos do lote B, contudo inferiores aos limites dos critérios microbiológicos dispostos no regulamento (CE) n.º 1441/2007 de 5 de dezembro. Verifica-se não existir qualquer influência da redução de cloreto de sódio no queijo, seja por substituição com KCl ou pela sua simples redução gradual, no crescimento e proliferação de *Staphylococcus*. O manuseamento indevido durante e pós-fabrico poderá ter sido a causa mais provável para a contaminação por estafilocos (Carvalho *et al.*, 2007). Para este caso os colaboradores deveriam ser submetidos a uma supervisão relativamente à aplicação das Boas Práticas de Higiene estabelecidas pelo Plano de Autocontrolo da queijaria.

Tal como a flora microbiana láctea, existe uma flora microbiana adventícia que pode também contribuir para a maturação dos queijos e que inclui uma mistura complexa de bactérias do meio ambiente, conjuntamente com bolores e leveduras. Estes microrganismos contaminantes entram em contacto com o leite através do ar circundante durante o processo de fabrico, ou pela adição de fermentos lácteos ou do coagulante ou por contacto com equipamentos não higienizados devidamente, sendo que quando as condições dentro da massa do queijo sejam propícias a estes microrganismos adventícios, estes iniciam o seu crescimento (Arenas *et al.*, 2004). Julga-se que as leveduras desempenham funções importantes, podendo contribuir para a utilização do ácido láctico e para os aumentos das taxas de proteólise e de lipólise com o subsequente aumento de compostos de baixo peso molecular responsáveis pelas características organoléticas do produto final (Tavaria *et al.*, 2006), particularmente em queijo de leite cru. Contudo, algumas espécies de bolores e de leveduras são capazes de provocar o sabor amargo, putrefação e formação de gás nos queijos (Hayaloglu *et al.*, 2002). Na generalidade, todos os queijos produzidos exibiram bolor, sendo que os queijos controlo e experimentais do lote B revelaram valores médios de bolores e leveduras significativamente superiores ($P < 0,05$) aos queijos do lote A. Este facto observado no lote B poderá dever-se à falha na aplicação do tratamento antifúngico para prevenção da esporulação nestes queijos (Var *et al.*, 2006), por imersão em solução diluída de natamicina, imediatamente logo a seguir à desenformagem e, eventualmente, às viragens irregulares na fase inicial de maturação dos mesmos. Acresce ainda a ocorrência de contaminação por via aérea (Temelli *et al.*, 2006).

Apesar da contaminação por *Enterobacteriaceae* nos queijos indicar a presença de bactérias entéricas, não foi isolada *Salmonella* spp. de nenhuma das amostras, assim como também não foi detetada a presença de *Escherichia coli*. Adicionalmente, não foi detetada a presença de *Listeria monocytogenes*.

Em suma, verifica-se que a redução de cloreto de sódio no queijo, por substituição com cloreto de potássio ou por redução simples gradual, não exerce influência significativa nas contagens dos germes totais, porém poderá influenciar ($P < 0,05$) o desenvolvimento de bactérias entéricas em queijos salgados apenas com 25% NaCl, tal como observado para o lote A.

3.4 Avaliação do Efeito nas Frações Azotadas na Proteólise

A evolução das frações azotadas (valores médios e desvios padrão), englobando o conjunto dos tratamentos de salga aplicados, está apresentada na figura 3.22, para comparação entre lotes A e B. A fração de azoto solúvel em água no lote A representa cerca de 32% do azoto total, aos 8 dias de cura, aumentando para 39% aos 40 dias de maturação; por sua vez, a fração azotada hidrossolúvel do lote B varia de 15 a 24% do azoto total, dos 8 aos 40 dias de maturação, ligeiramente inferior aos limites dispostos na DOP do queijo do Pico de leite cru para o coeficiente de maturação de 25 a 34%, possivelmente devido a diferenças verificadas nos valores de azoto total e de humidade relativas aos queijos experimentais, uma vez que o azoto solúvel (WSN) variou de 1,5 a 2,1%, em base seca, encontrando-se dentro dos limites estabelecidos para este queijo tradicional (0,43 a 2,12%).

A fração azotada solúvel em 12%TCA no lote A contabilizou, em média, cerca de 16 a 24% do TN, dos 8 aos 40 dias de cura, sendo que a fração TCASN do lote B contabilizou 10 a 12% do TN no mesmo período de tempo. O azoto solúvel em 5% PTA no lote A variou cerca de 4 a 5% do TN, dos 8 aos 40 dias de maturação, e o PTASN no lote B contabilizou 2 a aproximadamente 5% do TN no mesmo período de cura. A fração amoniacal variou entre 0,3 a 0,8% do TN, no lote A, e de 0,6 a cerca de 0,7% do TN, no lote B, dos 8 aos 40 dias de cura, respetivamente.

Assim, registaram-se valores exageradamente elevados de WSN/TN no início da maturação do lote A para o queijo tradicional de São João do Pico e sem variação relevante ao longo de toda a cura, sendo este efeito extensivo às outras frações azotadas do mesmo lote, TCASN/TN e PTASN/TN. Tal como observado no lote B, o queijo de São João caracteriza-se por índices de proteólise baixos (Despacho Normativo 32/96 de 29 de outubro), contudo, de ascendência gradual significativa ($P < 0,05$) ao longo do tempo de maturação.

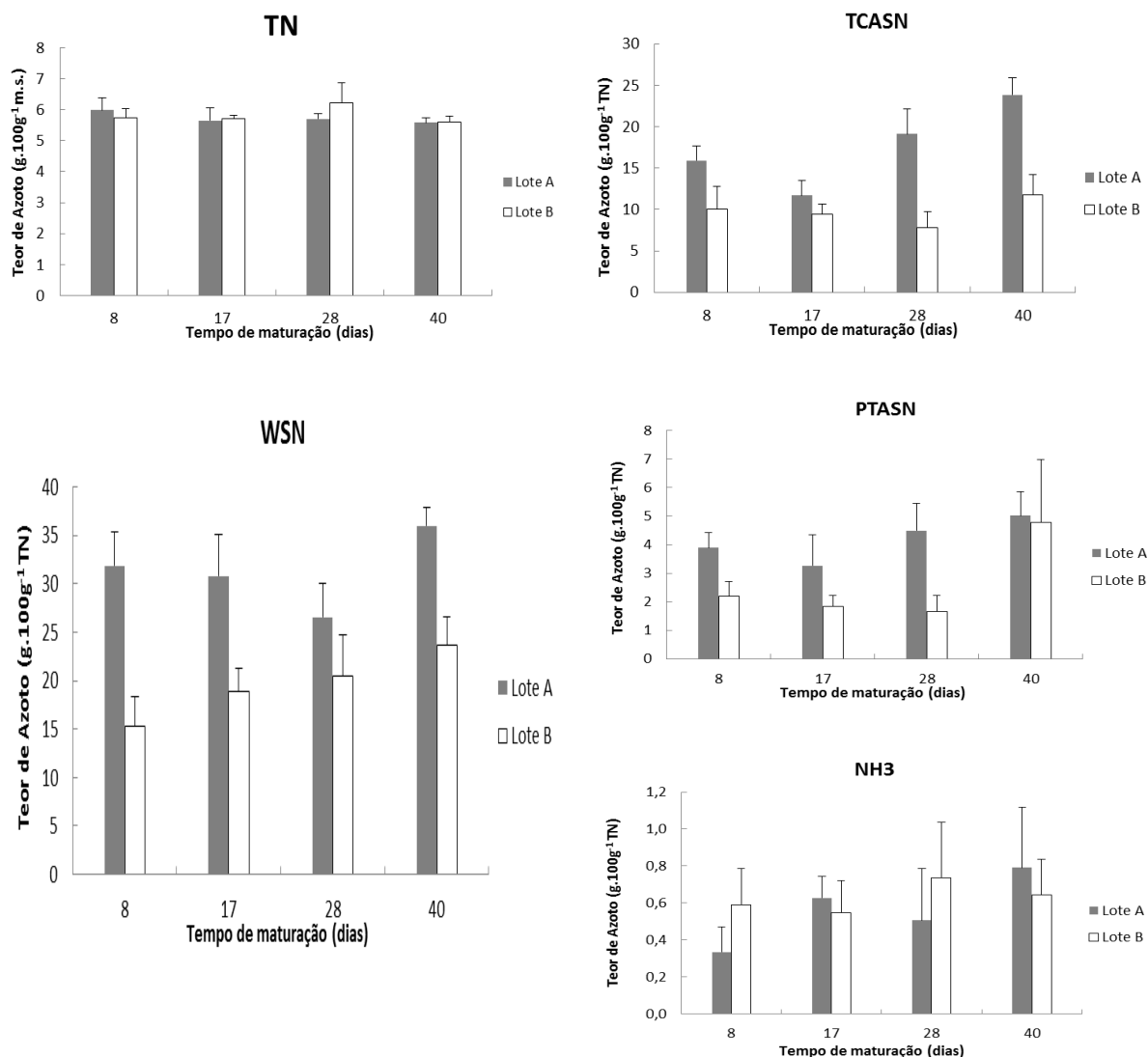


Figura 3.22 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para azoto total (TN) expresso em % de massa seca (m.s.); e para azoto solúvel em água (WSN), azoto solúvel em 12% TCA (TCASN), azoto solúvel em 5% PTA (PTASN) e azoto amoniacal (NH₃), todos expressos em % TN, obtidos no queijo São João para os lotes A e B ao longo da maturação.

A fração de azoto hidrossolúvel é muito heterogénea por incluir, na sua composição, proteínas do soro e péptidos de baixo, médio e elevado pesos moleculares, bem como aminoácidos livres (Tavaria *et al.*, 2003), provenientes da proteólise das caseínas. O conjunto de reações denominado de proteólise secundária resulta da ação do coagulante residual, neste caso quimosina, e proteases endógenas do leite, juntamente com proteases e peptidases da flora microbiana láctea e adventícia (Tavaria *et al.*, 2003). A evolução gradual significativa ($P < 0,05$) do rácio WSN/TN, ao longo da maturação do lote B, deveu-se fundamentalmente à ação proteolítica do coagulante residual, quimosina, controlada por outros fatores inerentes ao produto fresco e à própria cura, como temperatura e humidade relativa. Os valores de WSN do queijo de São João não correspondem apenas aos produtos de hidrólise da caseína que são solúveis em água, pois para além dos

polipéptidos resultantes da proteólise, o extrato solúvel em água pode conter também proteínas do soro lácteo (fundamentalmente α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina) (Katsiari *et al.*, 2000). Os valores excessivos da fração azotada solúvel em água para o lote A deveram-se, muito provavelmente, a uma deficiente conservação das amostras nos terminais de carga dos aeroportos e no transporte aéreo a temperaturas superiores a 25 °C, facto que terá incorrido na aceleração do metabolismo bioquímico, porquanto o fabrico deste lote decorreu no final da época de Verão.

Os valores para a fração de azoto não proteico (TCASN/TN) foram inferiores aos observados para a fração WSN/TN, tal como era esperado de acordo com Kuchroo & Fox (1982), que demonstraram que a fração de azoto solúvel em TCA continha, fundamentalmente, péptidos curtos (2-20 resíduos de aminoácidos) resultantes da ação de proteases e endopeptidases das bactérias do ácido láctico sobre os oligopéptidos produzidos inicialmente na degradação da caseína nativa pelo coagulante residual, e aminoácidos livres resultantes da hidrólise dos péptidos curtos pelas exopeptidases intracelulares microbianas da flora láctea e adventícia (Sousa *et al.*, 2001; Upadhyay *et al.*, 2004). A fração TCASN/TN é considerada como uma medida do grau de profundidade da proteólise, uma vez que a maior parte dos péptidos constituintes da fração azotada hidrossolúvel precipita em presença de concentrações de 12% TCA (m/v) (Tavaria *et al.*, 2003).

Os valores de TCASN obtidos no lote A foram significativamente superiores ($P<0,05$) aos do lote B, denotando uma maior quantidade de substâncias azotadas provenientes da proteólise excessiva verificada nos queijos do lote A, por ação das enzimas do coagulante, da ação de proteases e peptidases dos microrganismos proteolíticos presentes, correspondendo às contagens dos totais viáveis aos 17 dias de cura que deverão referir-se, maioritariamente, a bactérias do ácido láctico constituintes dos fermentos lácteos adicionados ao leite, posteriormente à sua pasteurização (Tavaria *et al.*, 2003). O azoto não proteico do lote B, apesar de aumentar ao longo do tempo de maturação, não demonstrou variação significativa, à exceção do período de tempo dos 28 a 40 dias de cura ($P<0,05$).

A fração de azoto aminoacídico, PTASN corresponde à medida de concentração de aminoácidos livres resultantes da hidrólise de péptidos curtos pelas exopeptidases da flora microbiana láctea e adventícia (Sousa *et al.*, 2001; Upadhyay *et al.*, 2004), sendo esta fração inferior ao azoto não proteico. Verificou-se um aumento de 188% no azoto solúvel em 5% PTA entre os 28 e os 40 dias de maturação no lote B, sendo o acréscimo mais elevado registado nesta fração com uma taxa de proteólise de aproximadamente 15,7% d⁻¹. Em ambos os lotes, apesar de algumas oscilações, o azoto aminoacídico, no global, aumentou significativamente ($P<0,05$) ao longo da maturação, tendo atingido graus semelhantes de índices de profundidade de proteólise aos 40 dias de cura (5% do azoto total).

O gráfico do PTASN (%TN) dos lotes A e B (Figuras 3.23 e 3.24) apresenta um perfil comportamental idêntico ao do azoto não proteico, o que reforça a hipótese da ação proteolítica e peptidásica, nestas

frações, serem de origem microbiana (Tavaria *et al.*, 2003), de acordo com Upadhyay *et al.* (2004) e Sousa *et al.* (2001) que descrevem a constituição de bactérias lácticas proteolíticas, relativamente ao seu sistema enzimático de proteases e peptidases capaz de hidrolisar oligopéptidos em péptidos curtos e aminoácidos para permitir o seu crescimento e que também contribui para o desenvolvimento do sabor e aroma nos queijos. De modo sucinto, durante o crescimento das bactérias lácticas no leite, o passo inicial consiste na degradação dos péptidos longos, provenientes da ação das enzimas coagulantes sobre a caseína, pela protease associada à membrana celular (lactocepina) em péptidos curtos, estes últimos são transportados para o interior da célula microbiana, mediante um sistema de transporte, no qual são posteriormente hidrolisados a aminoácidos pelas diversas peptidases intracelulares existentes (Upadhyay *et al.*, 2004).

Pela análise dos gráficos, observaram-se aumentos mais visíveis na fração de azoto aminoacídico a partir dos 17 dias de cura para o lote A e a partir dos 28 dias para o lote B. De notar que o queijo tradicional de São João não exibiu valores elevados de PTASN, o que reflete uma atividade peptidásica ténue das floras microbianas láctea e adventícia, uma vez tratar-se de um queijo de cura pouco intensa. Adicionalmente, as diferenças de azoto aminoacídico entre lotes A e B, no final da maturação, verificaram-se ser significativamente menos notórias. Este fenómeno, possivelmente, poderá dever-se a dois fatores. Primeiro, à flora microbiana láctica presente no queijo e que é responsável pela libertação de aminoácidos que poderão ser metabolitos precursores de compostos voláteis responsáveis pelas características organoléticas dos queijos (Yvon & Rijnen, 2001), sendo que para testar esta hipótese seria de interesse, em futuros trabalhos, a identificação dos aminoácidos presentes na matriz do queijo, bem como o isolamento e identificação dos compostos voláteis. Segundo, à semelhança do queijo Cheddar e muitos outros queijos, nos quais se verifica que à medida que as bactérias lácticas viáveis, constituintes dos fermentos, sofrem um declínio, a flora microbiana adventícia, inicialmente diminuta, torna-se predominante num período de cerca de 4 semanas na maturação do queijo, dependendo da velocidade da fase de lise celular das primeiras, pelo que posteriormente permanece, sendo que a sua atividade proteolítica parece suprir a ação das bactérias lácteas, na qual são produzidos péptidos com pesos similares e aminoácidos livres (Sousa *et al.*, 2001). Pese embora o tipo tecnológico e o tempo maturação característico do queijo São João sejam bastante diferentes do queijo supra mencionado, seria igualmente interessante, para verificação deste pressuposto, pesquisar os níveis da flora microbiana láctea e secundária ao longo da maturação, em futuros trabalhos.

Apesar do queijo tradicional de São João ser de maturação curta, visto que para se cumprirem as especificações físicas e sensoriais típicas este queijo, obtido a partir de leite pasteurizado, a cura ser de 17 dias, determinou-se o azoto amoniacal, resultante de reações de desaminação enzimática microbiana (McSweeney, 2004), características do final da cadeia das reações de proteólise, fração que, em termos absolutos, exibiu valores residuais para este tipo de queijo, tal como esperado, enquadrando-se nos limites dispostos na DOP do queijo do Pico. No geral, o lote B revelou teores mais elevados de azoto amoniacal comparativamente ao lote A, principalmente aos 8 dias ($P < 0,05$).

Pese embora algumas oscilações, o azoto amoniacal aumentou ao longo da cura, em ambos os lotes e de modo significativo no lote A ($P < 0,05$).

Considerando os valores obtidos para as frações azotadas no queijo São João no lote B, uma vez que o lote A não deve ser considerado para o estudo devido a erros de ordem técnica e experimental, pôde concluir-se que este queijo foi submetido a uma extensão moderada a baixa na proteólise e relativamente baixa em profundidade. Péptidos longos e médios são libertados preferencialmente durante o primeiro estágio da maturação, o qual se reflete pelos valores elevados obtidos para as frações WSN e TCASN. As velocidades mais altas de libertação de aminoácidos foram alcançadas aos 28 dias a seguir ao fabrico, em que a fração PTASN, respeitante ao azoto aminoacídico, apresentou o aumento mais elevado entre os 28 e os 40 dias de maturação (cerca de $16\% d^{-1}$), o qual se pensa que poderá estar associado, muito provavelmente, com uma proliferação considerável de microrganismos proteolíticos neste estágio de maturação.

A evolução das frações azotadas (valores médios e desvios padrão) dentro dos diversos tratamentos de salga aplicados nos queijos dos lotes A e B encontram-se dispostas nas Figuras 3.23 e 3.24, respetivamente. Em ambos os lotes, e no que concerne ao estudo estatístico dos tratamentos de salga aplicados baseados nos resultados fornecidos pela ANOVA, não foram verificadas diferenças significativas entre tratamentos nas frações WSN, TCASN e PTASN, sendo que em todas as modalidades ter-se-á verificado uma evolução ascendente inerente a cada tratamento aplicado ao longo da maturação, tal como descrito em Katsiari *et al.* (2000, 2001). No lote A, as médias das diversas frações dentro dos tratamentos ao longo da maturação variaram, em média, de 28 a 34% WSN, de 16 a 20% TCASN e 4 a 5% PTASN do azoto total; e, por sua vez, no lote B registaram-se variações de 15 a 22% WSN, 8 a 11% TCASN e 2 a 3% PTASN para o azoto total. Tal como foi mencionado, os valores obtidos para o lote A foram extremamente elevados, enquanto no lote B, obtiveram-se valores mais característicos do queijo tradicional de São João, de acordo com o especificado na DOP do queijo do Pico.

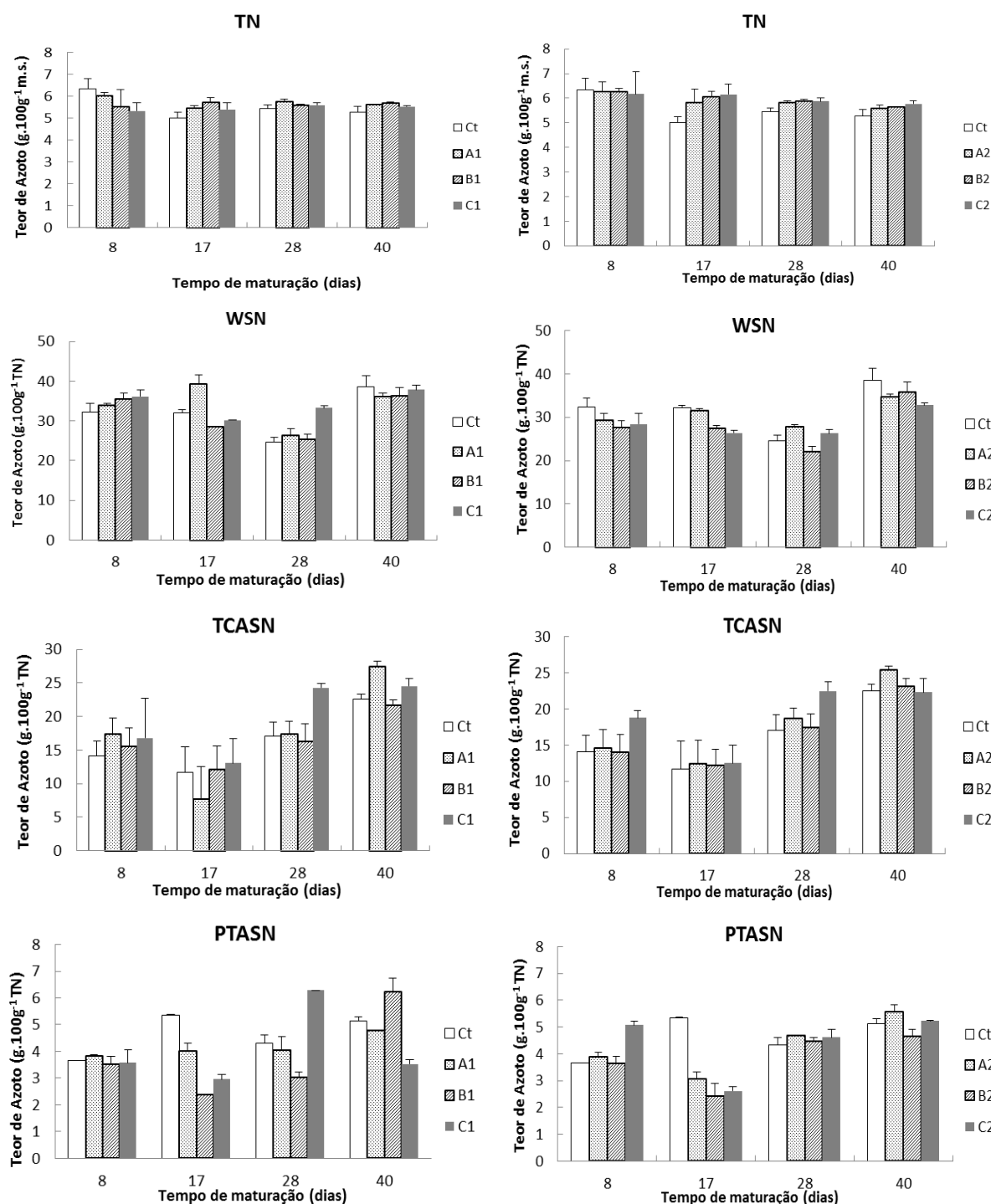


Figura 3.23 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para o azoto total (TN), expresso em % de massa seca (m.s.); e para azoto solúvel em água (WSN), azoto solúvel em 12% TCA (TCASN) e azoto solúvel em 5% PTA (PTASN), todos expressos em % TN, obtidos no queijo São João para o lote A, relativos aos tratamentos da salga aplicados, ao longo da maturação.

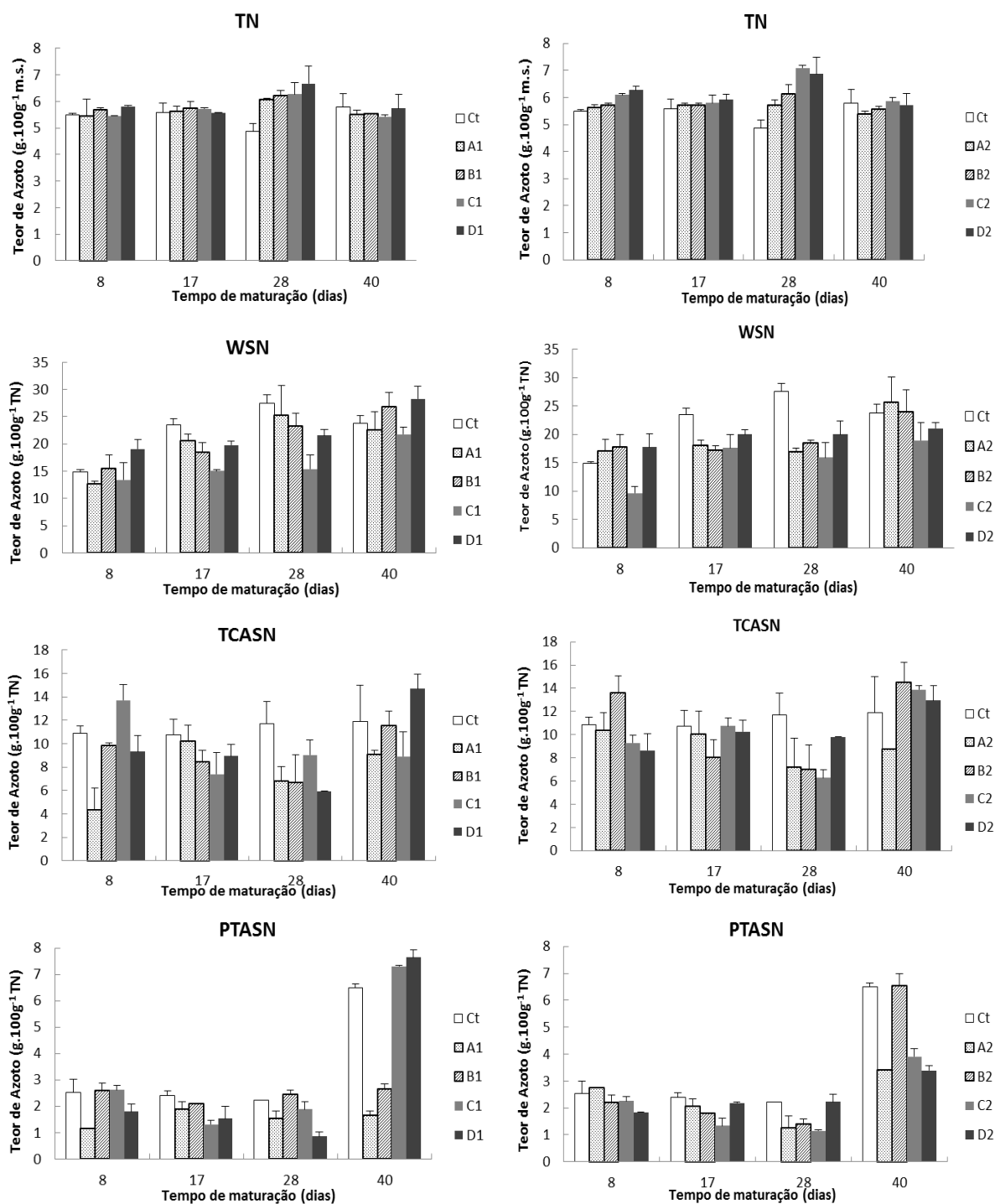


Figura 3.24 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para o azoto total (TN) expresso em % de massa seca (m.s.); e para azoto solúvel em água (WSN), azoto solúvel em 12% TCA (TCASN) e azoto solúvel em 5% PTA (PTASN), todos expressos em % TN, obtidos no queijo São João para o lote B, relativos aos tratamentos da salga aplicados, ao longo da maturação.

No lote A, em geral, verificaram-se que os valores dos queijos experimentais de mistura NaCl/KCl apresentaram valores de WSN ligeiramente superiores aos queijos controlo e experimentais de redução simples gradual até aos 28 dias de cura, porém não significantes ($P>0,05$), tendo posteriormente diminuído relativamente ao queijo controlo, provavelmente devido à perda de água ao longo da cura e não ao processo de proteólise em si. De notar que os queijos experimentais respeitantes à redução simples exibiram valores WSN ligeiramente inferiores ($P>0,05$) ao queijo controlo devido à desidratação proteica gradual verificada à medida que o NaCl é reduzido ao longo das modalidades e que inibe o processo de proteólise por retardamento da degradação da caseína α_{s1} pelo coagulante residual, resultando em queijos mais duros e quebradiços (Perry, 2004; Cruz *et al.*, 2011). No lote B, verificou-se que os queijos experimentais, tanto de mistura NaCl/KCl como de redução simples gradual, apresentaram valores ligeiramente inferiores ao queijo controlo ($P>0,05$), podendo eventualmente indicar que o cloreto de potássio poderá não ser tão eficaz quanto o NaCl, em termos tecnológicos na contribuição para a extensão da proteólise, mas não de modo significativo. No geral, verifica-se que os queijos de salga com mistura NaCl/KCl exibiram valores WSN um pouco mais elevados que os queijos de redução simples gradual até 50% NaCl aproximadamente nas quatro primeiras semanas, provavelmente devido à maior capacidade de retenção de água por parte dos primeiros.

No lote A, os níveis de TCASN/TN em todos os queijos foram estatisticamente semelhantes ao longo da maturação, pese embora os queijos experimentais apresentarem rácios ligeiramente superiores aos do queijo controlo, o que está de acordo com o obtido em Katsiari *et al.* (2000) para o queijo Feta fabricado com leite de ovelha pasteurizado e com substituição parcial (3:1 e 1:1) de NaCl por KCl. No lote B, o azoto solúvel em 12% TCA dos queijos de São João experimentais foram semelhantes ao queijo controlo, contudo ligeiramente inferiores ao longo da maturação, à semelhança de Katsiari *et al.* (2001) para o queijo Kefalograviera salgado com misturas (3:1 e 1:1) NaCl/KCl, com exceção dos tratamentos de salga D1 (100% KCl), B2 (50% NaCl), C2 (25% NaCl) e D2 (isenção total de NaCl) aos 40 dias. Nestes, obtiveram-se maiores índices de profundidade de proteólise à medida que o teor de NaCl foi reduzido ao longo das modalidades de ensaio. De um modo geral, verifica-se que os queijos de redução simples gradual de NaCl apresentam valores relativamente mais altos que os queijos com salga de mistura NaCl/KCl até uma redução de 75% de sal, ao longo do período de maturação.

No que concerne ao azoto aminoacídico, os queijos experimentais de mistura NaCl/KCl dos lotes A e B, exibiram valores de PTASN semelhantes ao controlo ao longo da maturação, contudo, ligeiramente inferiores, com exceção das modalidades C1 (1:3 NaCl/KCl) e D1 (100% KCl), a partir das 4 semanas de cura. De notar os queijos com 25 e 0% NaCl do lote B, que obtiveram valores de PTASN/TN consideravelmente mais baixos comparativamente ao queijo controlo e que poderá dever-se, possivelmente, à sobreposição do efeito de desidratação proteica sobre a intensificação do crescimento bacteriano, podendo resultar na inibição da ação das peptidases microbianas por lise celular (Upadhyay *et al.*, 2004).

Assim, considerando os resultados de grau de profundidade de proteólise para as frações TCASN e PTASN obtidas para os queijos do lote B salgados com mistura NaCl/KCl, estes devem-se, provavelmente, à maior capacidade de retenção de água na matriz dos mesmos comparativamente aos queijos experimentais de redução simples, o que propicia melhores condições de desenvolvimento bacteriano e subsequentemente numa maior atividade proteolítica e peptidásica dos microrganismos no queijo, hipótese que está de acordo com o estudo realizado por Ayyash e Shah (2010) para o queijo Halloumi, o qual indica um aumento de bactérias do ácido láctico ao longo da cura e ao longo das modalidades de substituição gradual de sódio por potássio até pelo menos 50%.

Considerando os valores das frações azotadas obtidas para o lote B, temos que, de um modo geral, as frações WSN, respeitantes aos queijos de mistura NaCl/KCl, apresentaram uma tendência ascendente inerente a cada modalidade de ensaio ao longo da cura; por sua vez, os azotos não proteico e aminoacídico mantiveram-se relativamente constantes entre as modalidades até aos 28 dias de maturação, apresentando uma subida significativa para PTASN/TN aos 40 dias. Os queijos experimentais de redução gradual simples apresentaram um comportamento análogo aos anteriores dentro das modalidades, até aos 28 dias de maturação, no que respeita às frações de TCASN e PTASN, indiciando que a redução de sódio, isoladamente ou por substituição, não teve efeitos consideravelmente significativos nestas frações azotadas até, aproximadamente, às 4 semanas.

Em suma, não foram encontradas diferenças significativas entre os queijos experimentais e o queijo controlo no que respeita à extensão e profundidade da proteólise ao longo da maturação, à semelhança dos resultados obtidos por Katsiari *et al.* (2000, 2001) para os queijos Feta e Kefalograviera salgados com substituição parcial de NaCl por KCl até 50%, nos quais a proteólise não foi afetada, mais especificamente, nos níveis de azoto solúvel a pH 4,6, de azoto não proteico e de azoto aminoacídico associados a estes queijos.

Por analogia ao coeficiente de maturação obtido neste estudo, os queijos experimentais do lote A também obtiveram valores de TCASN e PTASN significativamente ($P < 0,05$) mais elevados em relação aos queijos do lote B devido, fundamentalmente, à aceleração do metabolismo bioquímico pelo calor. Seria de interesse, em futuros trabalhos relativos a este tema, compreender a complexidade inerente à composição das frações azotadas WSN, TCASN e PTASN por recurso a técnicas de focagem isoeletrica e de cromatografia.

Por fim, no que concerne às determinações de azoto amoniacal (Figuras 3.25 e 3.26), não foram verificadas diferenças significativas entre tratamentos no lote A, variando o azoto amoniacal, em média, de 0,38 a 0,88% do azoto total; por sua vez, no lote B, o azoto amoniacal variou, em média, entre 0,6 e 1,0% do azoto total, tendo-se verificado, apenas, uma modalidade de salga significativamente diferente ($P < 0,05$) das demais, correspondendo esta à amostra de queijo isento em sal (D2).

Observou-se que a amostra padrão, bem como os queijos experimentais de mistura NaCl/KCl do lote A apresentaram valores NH_3/TN inferiores aos queijos experimentais de redução gradual simples, sendo que nestes últimos, verificou-se um aumento gradual do rácio NH_3/TN à medida que se reduz o NaCl, ao longo da maturação, muito provavelmente devido à maior degradação proteica medida nestes queijos. No lote B, verificou-se que os rácios NH_3/TN dos queijos experimentais, de mistura NaCl/KCl e redução gradual simples, eram semelhantes entre si e ao queijo controlo.

No geral, os queijos salgados com mistura NaCl/KCl apresentaram-se semelhantes entre si e ao queijo controlo ao longo da cura, apesar do queijo totalmente substituído por KCl apresentar no final da maturação maiores teores de amoníaco, mas não de modo significativo. Por sua vez, os queijos experimentais de redução gradual simples demonstraram constância nos valores de azoto amoniacal, dentro das modalidades e ao longo da maturação, tendo o queijo sem sal se destacado por apresentar teores de amoníaco significativamente superiores ($P < 0,05$) durante todo o período de cura considerado para o estudo deste queijo, o que poderá indicar uma falta de controlo no crescimento bacteriano (Sousa *et al.*, 2001).

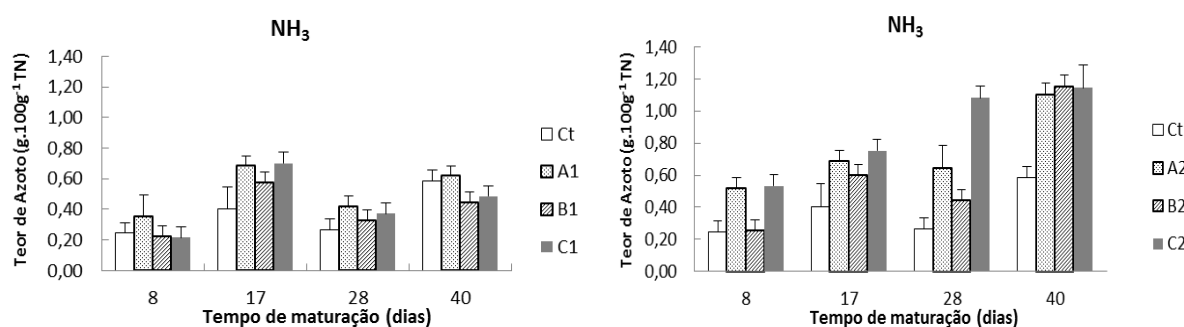


Figura 3.25 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para o azoto amoniacal (NH_3), expresso em %TN, obtido no queijo São João para o lote A, relativo aos tratamentos da salga aplicados, ao longo da maturação.

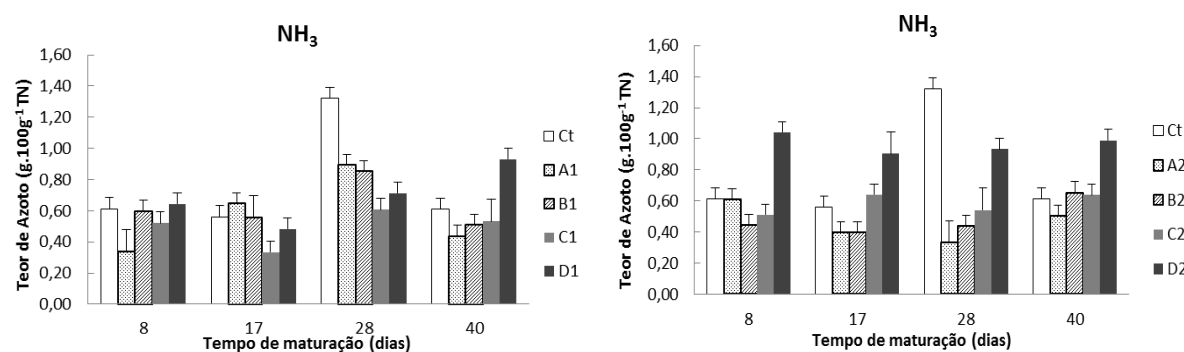


Figura 3.26 – Valores médios e desvios padrão correspondentes para o azoto amoniacal (NH_3), expresso em %TN, obtido no queijo São João para o lote B, relativo aos tratamentos da salga aplicados, ao longo da maturação.

Assim, verifica-se que a substituição do sódio por cloreto de potássio não influenciou significativamente a atividade microbiana na produção de amoníaco, ao longo do período de maturação considerado para este estudo. Pelo contrário, a redução simples de sal poderá estimular significativamente ($P<0,05$) a produção de amoníaco pelos microrganismos presentes no queijo, principalmente nas reduções total do sal de cloreto de sódio.

3.5 Propriedades Físicas

3.5.1 Análise de Perfil de Textura

Os resultados de dureza, coesividade e adesividade dos queijos de São João do Pico salgados com NaCl apenas (Controlo, A2, B2 e C2) e com misturas de NaCl/KCl (A1, B1 e C1), bem como dos queijos totalmente substituídos por KCl (D1) e isentos em sal (D2), foram obtidos após 17 dias de maturação do lote C e apresentam-se na tabela 3.6.

Tabela 3.6: Propriedades texturais do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.

Tratamento da salga ^A	Dureza ^B (N)	Coesividade ^B	Adesividade ^B (-N.mm)	Tratamento da salga ^A	Dureza ^B (N)	Coesividade ^B	Adesividade ^B (-N.mm)
C	5,023±1,541	0,673±0,033	4,515±0,911				
A1	5,725±0,314	0,577±0,029	3,710±1,688	A2	8,097±2,840	0,466±0,006	3,087±0,272
B1	7,882±0,460	0,478±0,004	5,245±0,060	B2	11,086±0,352	0,408±0,007	3,193±0,287
C1	6,930±0,139	0,503±0,009	4,536±0,244	C2	11,719±0,442	0,373±0,004	2,213±0,081
D1	8,021±0,331	0,459±0,009	4,749±0,260	D2	11,684±0,371	0,370±0,010	1,376±0,193

^A Tratamento da salga: C = 100% NaCl (controlo); A1 = 3NaCl:1KCl (m/m); B1 = 1NaCl:1KCl (m/m); C1 = 1NaCl:3KCl (m/m); D1 = 100% KCl; A2 = 75% NaCl; B2 = 50% NaCl; C2 = 25% NaCl; D2 = 0% NaCl.

^B Valores médios ± desvio padrão referentes a dois ensaios, sendo n = 5 para cada ensaio.

De um modo geral, os queijos salgados com mistura NaCl/KCl apresentaram-se com dureza inferior aos queijos salgados com redução simples do teor em NaCl ($P<0,05$); contudo, apresentaram maior dureza comparativamente ao queijo controlo, mas de um modo não significativo ($P>0,05$). Verificou-se também que a dureza aumentou ao longo das modalidades de ensaio, seja por substituição ou por redução simples de sal. Uma justificação provável para estas observações poderá ser que no decurso na maturação de muitos tipos de queijos, a matriz proteica, inicialmente com textura granular, é convertida a uma estrutura mais ligada, com uma massa homogénea, sendo que o amaciamento e o amolecimento da pasta ocorrem devido à proteólise da caseína α_{s1} , pela ação da quimosina (Katsiari *et al.*, 1997, 1998), embora não seja este o único fator. O sal como o cloreto de potássio, KCl, pelos resultados obtidos poderá influenciar a proteólise da caseína α_{s1} de um modo quase tão eficaz como o NaCl até uma substituição de cerca de 75% (Guinee & Fox, 2004). Pelo contrário, observa-se que uma redução de sal superior a 25% afeta negativamente a textura do queijo, sendo que a dureza aumenta, de modo indesejável no caso deste queijo. Este endurecimento pode dever-se a um

retardamento da decomposição da caseína α_{s1} (Guinee & Fox, 2004), como também ao aumento do efeito de desidratação para níveis muito reduzidos de sal (Alvarenga, 2008; Ayyash & Shah, 2010).

Os queijos salgados com mistura NaCl/KCl revelaram menor coesividade ($P>0,05$) relativamente aos queijos controlo e significativamente maior coesividade ($P<0,05$) comparativamente aos queijos com redução gradual simples de sal. A coesividade diminuiu ao longo das modalidades de ensaio, seja por substituição ($P>0,05$) ou por redução simples de sal, nestes últimos de modo significativo ($P<0,05$). Este decréscimo na coesividade pode ser devido à redução do Ca e ao aumento da proteólise (Ayyash *et al.*, 2010).

Os queijos experimentais de salga por mistura NaCl/KCl apresentaram adesividade semelhante ao queijo controlo e significativamente maior ($P<0,05$) que os queijos de redução gradual isolada em NaCl, sendo que nestes últimos se verificou uma diminuição deste parâmetro de textura com a redução concomitante de sal ($P<0,05$). Tal facto poderá dever-se ao retardamento da proteólise da caseína α_{s1} e ao aumento do efeito de desidratação nos queijos com redução gradual isolada de cloreto de sódio (Alvarenga, 2008).

Uma vez que não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros da dureza, coesividade e adesividade entre os queijos experimentais salgados com mistura NaCl/KCl para o mesmo período de maturação (17 dias), há indicação de que o KCl poderá desempenhar um papel semelhante ao NaCl no queijo tradicional de São João do Pico, pelo menos até 75% de substituição. Estas observações estão de acordo com o obtido por Katsiari *et al.* (1997, 1998) e Ayyash *et al.* (2010) para os queijos Feta, Kefalograviera e Halloumi, respetivamente.

3.5.2 Cor

A análise instrumental da cor da pasta e da crosta do queijo São João pelo sistema de coordenadas CIELAB foi realizada aos 17 dias de maturação e encontra-se sumarizada na tabela 3.7.

Tabela 3.7: Parâmetros da cor relativos à pasta e à crosta do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.

Tratamento da salga ^A		Cor – L* ^B	Cor – a* ^B	Cor – b* ^B	Tratamento da salga ^A		Cor – L* ^B	Cor – a* ^B	Cor – b* ^B
Pasta	C	82,56 ± 0,12	-5,64 ± 0,04	23,62 ± 0,37	Pasta	A2	84,57 ± 0,38	-5,52 ± 0,16	21,48±0,38
	A1	84,31 ± 0,38	-5,34 ± 0,21	21,58 ± 0,75		B2	85,03 ± 0,24	-5,38 ± 0,11	21,12 ± 0,31
	B1	84,78 ± 0,37	-5,40 ± 0,13	21,16 ± 0,48		C2	85,96 ± 0,02	-5,23 ± 0,02	20,41±0,02
	C1	85,13 ± 0,27	-5,32 ± 0,20	21,35 ± 0,33		D2	87,14 ± 0,09	-5,08 ± 0,09	19,62±0,08
	D1	85,26 ± 0,01	-5,51 ± 0,09	21,32±0,07					
Crosta	C	78,11 ± 0,71	-4,78 ± 0,10	28,04 ± 0,57	Crosta	A2	79,94 ± 0,91	-5,44 ± 0,07	29,08 ± 1,27
	A1	79,75 ± 0,04	-5,37 ± 0,06	30,10 ± 0,84		B2	79,22 ± 0,04	-5,55 ± 0,12	28,85 ± 0,80
	B1	80,89 ± 0,43	-5,63±0,01	29,30 ± 0,44		C2	78,88 ± 0,77	-5,58 ± 0,09	28,66 ± 0,98
	C1	84,40 ± 4,70	-5,59 ± 0,06	30,10 ± 0,18		D2	78,18 ± 3,11	-5,57 ± 0,02	29,67 ± 2,79
	D1	81,49 ± 1,15	-6,25 ± 0,09	30,31 ± 1,59					

^A Tratamento da salga: C = 100% NaCl (controle); A1 = 3NaCl:1KCl (m/m); B1 = 1NaCl:1KCl (m/m); C1 = 1NaCl:3KCl (m/m); D1 = 100% KCl; A2 = 75% NaCl; B2 = 50% NaCl; C2 = 25% NaCl; D2 = 0% NaCl.

^B Valores médios ± desvio padrão referentes a dois ensaios, sendo n = 10 para cada ensaio relativo à pasta e n = 20 para cada ensaio referente à crosta.

A análise de variância indicou que a luminosidade (L*) da pasta do queijo São João foi significativamente superior à da crosta do queijo ($P<0,05$), tendo variado na pasta de 82,56 na amostra controle a 87,14 na modalidade de ensaio isenta de sal e, na crosta, de 78,11 a 84,40 no queijo convencional e no queijo salgado com mistura NaCl/KCl (1:3), respetivamente. Os valores da componente b* foram significativamente superiores na crosta ($P<0,05$) comparativamente à pasta do queijo, tendo variado de 19,62 a 23,62 na pasta, no queijo isento de sal e na amostra controle, respetivamente; e, de 28,04 a 30,31 na crosta, no queijo convencional e no queijo salgado com 100% KCl. Por sua vez, os valores do parâmetro a* variaram entre -5,64 e -5,08 na pasta ($P>0,05$), para a amostra controle e para o queijo isento de sal, respetivamente, e de -6,25 a -4,78 na crosta ($P<0,05$) para o queijo salgado com 100% KCl e para o queijo controle. Acresce ainda que relativamente aos tratamentos de salga aplicados não foram verificadas diferenças significativas na coordenada a* na pasta do queijo, tendo se verificado um aumento e uma diminuição significava ($P<0,05$) da luminosidade (parâmetro L*) e da cor amarela (componente b*), respetivamente, no interior do queijo com a redução gradual em sódio, principalmente nas modalidades de ensaio sem substituição; por sua vez, na crosta dos queijos controle e experimentais não foram verificadas diferenças significativas nas coordenadas que melhor permitem discriminar a cor nos queijos, L* e b*.

Os valores de L* obtidos na pasta de todos os queijos experimentais foram superiores aos do queijo controle, tanto na pasta ($P<0,05$) como na crosta ($P>0,05$). Verificou-se um aumento significativo dos valores de L* da pasta ao longo das modalidades de ensaio associadas a cada tipologia de salga, sendo que os queijos experimentais de redução simples revelaram ser mais claros, no seu interior, comparativamente aos queijos salgados com a mistura NaCl/KCl correspondente. De notar que o queijo salgado totalmente com KCl revelou-se significativamente ($P<0,05$) mais claro

comparativamente ao queijo controlo e aos queijos salgados por mistura NaCl/KCl. Pelo contrário, os valores da componente L^* na crosta dos queijos experimentais salgados com mistura NaCl/KCl foram superiores aos queijos de redução simples de Na. Os queijos salgados até 75% de substituição com KCl, exibiram um aumento não significativo de luminosidade, sendo que a modalidade de ensaio salgada com 100% KCl apresentou uma tonalidade mais escura à superfície, provavelmente devido à maior dificuldade do esgotamento do soro inerente a este queijo. Observou-se um decréscimo ligeiro ($P>0,05$) nos valores de L^* na crosta ao longo das modalidades de ensaio respeitantes à tipologia de redução gradual simples de cloreto de sódio devido ao efeito de desidratação ocorrido para queijos de concentração de NaCl reduzidas, que se tornaram mais escuros junto à superfície com a diminuição da quantidade de sal.

No que respeita aos valores da coordenada b^* da pasta, esta foi superior na amostra controlo comparativamente aos queijos experimentais, por vezes, de modo significativo ($P<0,05$), tendo se verificado o inverso ($P>0,05$) na crosta, em que os queijos experimentais exibiram uma tonalidade amarela mais intensa. De um modo geral, os valores da componente b^* na pasta decrescem ao longo das modalidades de ensaio de ambas as tipologias de redução de Na. Os queijos experimentais com salga por mistura exibiram uma tonalidade amarela mais acentuada, tanto na crosta como na pasta, relativamente aos queijos com redução simples de NaCl. Os queijos experimentais com maior redução de Na, tanto por substituição como por redução simples, obtiveram um amarelo mais pronunciado na crosta comparativamente às respetivas tipologias de tratamentos de salga, muito provavelmente devido a um maior efeito de desidratação à superfície destes queijos. De referir que o queijo de São João é fabricado com leite de vaca inteiro pasteurizado exibindo, consequentemente, níveis de gordura elevados na sua composição, o que lhe confere uma crosta amarela e uma pasta amarelada, tal como é observado no parâmetro cromático b^* (Alvarenga, 2008).

Relativamente à componente a^* , o queijo controlo exibe um carácter ligeiramente ($P>0,05$) mais esverdeado na pasta e significativamente menos esverdeado ($P<0,05$) comparativamente aos queijos experimentais, aos 17 dias de cura. Observou-se que o carácter esverdeado na pasta ($P>0,05$) e na crosta ($P<0,05$) dos queijos salgados com mistura NaCl/KCl aumenta à medida que se reduz o NaCl e aumenta a quantidade KCl adicionada. Pelo contrário, verifica-se que a tonalidade esverdeada na pasta diminui ($P>0,05$) à medida que se reduz o sal nos queijos, de forma gradual e isolada, pese embora aumentar, de modo muito ténue ($P>0,05$), a tonalidade verde na crosta dos mesmos.

Em suma, o queijo controlo revelou ter uma coloração amarela mais escura na pasta e uma crosta menos amarela, contudo menos luminosa comparativamente aos queijos experimentais, aos 17 dias de maturação. Os queijos experimentais associados à redução simples de sal revelaram um interior mais claro com uma menor tonalidade amarela, enquanto os queijos de salga por mistura NaCl/KCl obtiveram, de um modo geral, crostas mais claras com uma cor amarela ligeiramente mais intensa. Os tratamentos de salga por substituição aplicados não tiveram influência significativa na luminosidade da pasta até 75% KCl e até 50% de redução simples de cloreto de sódio, porém

diminuíram significativamente ($P < 0,05$) a tonalidade amarela no interior, característica deste queijo tradicional, principalmente nas reduções simples de Na a partir de 75%, o que sugere que a adição progressiva de cloreto de potássio inibe o efeito de redução do parâmetro cromático b^* , apesar de num modo não tão eficaz como o NaCl. Na crosta não houve alterações significativas nas coordenadas L^* e b^* com a aplicação das duas tipologias de salga inerentes aos diversos tratamentos de salga aplicados.

3.6 Avaliação Sensorial

3.6.1 Prova Triangular

Aos 17 dias de maturação, realizaram-se provas triangulares de avaliação sensorial dos queijos São João, para o lote A e para o lote B, com o intuito de detetar diferenças perceptíveis relativamente aos diversos tratamentos de salga aplicados durante o fabrico, no que concerne a atributos de sabor, textura (firmeza e macieza), cheiro e aparência. Os resultados da avaliação triangular estão sumarizados nas tabelas 3.8 e 3.9.

Tabela 3.8: Prova triangular aplicada ao lote A do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.

Tratamento da salga ^A	N.º Provas	N.º respostas corretas	Resultado ^B	Tratamento da salga ^A	N.º Provas	N.º respostas corretas	Resultado ^B
A1	30	15	A1 ≠ C	A2	30	19	A2 ≠ C
B1	30	19	B1 ≠ C	B2	30	21	B2 ≠ C
C1	30	26	C1 ≠ C	C2	30	21	C2 ≠ C

^A Tratamento da salga: C = 100% NaCl (controlo); A1 = 3NaCl:1KCl (m/m); B1 = 1NaCl:1KCl (m/m); C1 = 1NaCl:3KCl (m/m); A2 = 75% NaCl; B2 = 50% NaCl; C2 = 25% NaCl.

^B Resultados da avaliação estatística inferidos a partir da tabela A.1 da BS ISO 4120:2004 para $\alpha = 0,05$.

A avaliação dos queijos experimentais relativa ao lote A revelou que, tanto os produtos lácteos de salga por substituição com KCl como os de salga por redução simples gradual eram diferentes do queijo com salga convencional (controlo). Acresce ainda a observação nestes queijos experimentais de um sabor extremamente amargo e ácido, devido provavelmente a uma acidificação e uma proteólise exagerada, conforme descrito em 3.4 (*“Avaliação das Frações Azotadas na Proteólise”*). Por conseguinte, o resultado deste lote não será contabilizado para as considerações subsequentes.

Tabela 3.9: Teste do triângulo aplicado ao lote B do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, aos 17 dias de maturação.

Tratamento da salga ^A	N.º Provas	N.º respostas corretas	Resultado ^B	Tratamento da salga ^A	N.º Provas	N.º respostas corretas	Resultado ^B
A1	30	16	A1 ≠ C	A2	30	11	A2 = C
B1	30	13	B1 = C	B2	30	20	B2 ≠ C
C1	30	14	C1 = C	C2	30	15	C2 ≠ C
D1	30	12	D1 = C	D2	30	20	D2 ≠ C

^A Tratamento da salga: C = 100% NaCl (controlo); A1 = 3NaCl:1KCl (m/m); B1 = 1NaCl:1KCl (m/m); C1 = 1NaCl:3KCl (m/m); D1 = 100% KCl; A2 = 75% NaCl; B2 = 50% NaCl; C2 = 25% NaCl; D2 = 0% NaCl.

^B Resultados da avaliação estatística inferidos a partir da tabela A.1 da BS ISO 4120:2004 para $\alpha = 0,05$.

Pelo contrário, a avaliação sensorial (prova triangular) dos queijos experimentais do queijo São João do lote B revelou que os queijos com salga por mistura NaCl/KCl e com KCl apenas ter-se-ão revelado semelhantes ao queijo convencional, ao paladar do consumidor geral, à exceção da modalidade de ensaio NaCl/KCl (3:1) provavelmente devido à falta de padronização do método no decurso da etapa da salga verificada na determinação de sal, expresso em cloretos, e sódio. De facto, os queijos experimentais com salga por substituição resultaram bastante satisfatórios, principalmente em termos de sabor. Relativamente aos queijos experimentais de redução simples gradual de cloreto de sódio, verificou-se que uma redução em 25% de sal não conferia diferenças apreciáveis comparativamente ao queijo salgado com 100% NaCl. Contudo, à medida que o teor de NaCl foi reduzido (de B2 a D2) o sabor amargo e fermentado foram gradualmente notados, assim como o aumento da dureza e da fraturabilidade da massa do queijo que se intensificaram ao avançar nestas modalidades de ensaio.

3.6.2 Avaliação Hedónica

Por analogia, realizou-se o teste de aceitação, numa escala hedónica de 0 a 9 valores, a um total de 7 parâmetros sensoriais (aparência, cor, textura, consistência, sabor, cheiro e pasta) aos queijos São João constituintes do lote C, aos quais foram aplicados os diversos tratamentos de salga inerentes a este estudo. Esta prova foi realizada aos 17 dias de maturação, por este período de tempo ser considerado como a cura mínima para venda ao consumidor, para este queijo tradicional feito a partir de leite pasteurizado. Os resultados de aceitação pelo consumidor geral para os dados sensoriais de todos os 7 atributos sensoriais para cada um dos 9 tratamentos de salga (C, A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2) aos 17 dias de maturação encontram-se dispostos na tabela 3.10, sendo apresentados na forma de diagrama na Figura 3.27.

Tabela 3.10: Propriedades sensoriais do queijo São João salgado com NaCl ou mistura NaCl/KCl ou KCl apenas, no lote C, aos 17 dias de maturação.

Tratamento da salga ^A	Propriedade sensorial ^B							
	Aparência	Cor	Textura	Consistência	Sabor	Cheiro	Pasta	Qualidade global
C	7,03±0,03	7,42±0,05	7,09±0,09	7,06±0,13	7,66±0,34	7,05±0,42	7,07±0,07	7,20±0,24
A1	7,57±0,10	7,30±0,03	7,50±0,30	7,70±0,03	7,87±0,07	6,90±0,23	7,60±0,13	7,49±0,31
A2	7,10±0,03	7,27±0,00	7,07±0,00	6,97±0,17	6,87±0,47	6,55±0,02	6,53±0,13	6,91±0,28
B1	6,38±0,31	6,73±0,04	6,49±0,26	6,75±0,37	6,54±0,15	6,27±0,04	6,65±0,35	6,54±0,1
B2	6,71±0,04	6,64±0,04	6,60±0,40	6,57±0,30	6,60±0,27	6,35±0,02	5,90±0,16	6,48±0,28
C1	7,03±0,30	7,00±0,27	7,17±0,17	7,20±0,27	6,80±0,20	6,23±0,23	7,07±0,00	6,93±0,33
C2	5,98±0,48	6,79±0,08	6,06±0,20	5,93±0,07	5,32±0,32	5,87±0,13	5,65±0,08	5,94±0,45
D1	6,63±0,17	6,87±0,00	6,33±0,14	6,30±0,17	5,90±0,03	6,20±0,40	6,17±0,23	6,34±0,32
D2	5,61±0,67	6,09±0,84	5,10±0,97	4,70±0,45	2,76±0,38	5,33±0,96	3,67±0,98	4,75±1,16

^A Tratamento da salga: C = 100% NaCl (controlo); A1 = 3NaCl:1KCl (m/m); A2 = 75% NaCl; B1 = 1NaCl:1KCl (m/m); B2 = 50% NaCl; C1 = 1NaCl:3KCl (m/m); C2 = 25% NaCl; D1 = 100% KCl; D2 = 0% NaCl.

^B Valores médios ± desvio padrão referentes a dois ensaios.

A análise da variância revelou diferenças significativas ($P<0,05$) entre tratamentos de salga e salga convencional relativamente aos atributos da aparência, sabor, pasta e consistência, apesar de não terem sido detetadas diferenças significativas na textura, à semelhança do referido por Katsiari *et al.* (1997, 1998). O queijo controlo e o queijo salgado com mistura NaCl/KCl (3:1) receberam pontuações globais ligeiramente superiores aos restantes queijos experimentais, sendo essa diferença significativa ($P<0,05$) para os queijos experimentais com redução por substituição ou redução simples de cloreto de sódio, a partir do decréscimo em 50% NaCl, inclusive.

No que respeita aos queijos salgados com mistura NaCl/KCl, os queijos salgados com substituição de 25% KCl obtiveram uma pontuação mais elevada no sabor, bem como nos parâmetros da aparência, textura, consistência e pasta, comparativamente ao queijo controlo, apesar de não terem sido detetadas diferenças apreciáveis ($P>0,05$) entre esta modalidade experimental e o queijo controlo. Segundo alguns autores, o cloreto de sódio pode mascarar defeitos de sabor, porém este efeito é dependente do teor de sal adicionado e dos tipos de compostos químicos produzidos durante o tempo de prateleira (Katsiari *et al.*, 1998). À medida que a quantidade de KCl aumentou, a partir de 25% de substituição, o queijo tornou-se gradualmente menos aceitável devido a um maior sabor amargo, metálico e ligeiramente picante, durante e após a mastigação, bem como à maior humidade inerente à pasta; contudo, as diferenças relativamente aos atributos sensoriais não tiveram significado estatístico, sendo apenas significativas ($P<0,05$) em termos de aceitação global do produto. O facto pelo qual o queijo salgado com NaCl/KCl (3:1) não exibir um sabor amargo/metálico pode ser atribuído ao efeito “máscara” do NaCl sobre o KCl (Katsiari *et al.*, 1998). Também a perda na consistência destes queijos experimentais, com salga NaCl/KCl (1:1 e 1:3) e 100% KCl ($P>0,05$), pode dever-se à textura granulosa da massa destes queijos. Resultados semelhantes foram observados em estudos relativos ao efeito da substituição parcial de NaCl por KCl até 50% em queijos Feta (Katsiari *et al.*, 1997) e Kefalograviera (Katsiari *et al.*, 1998) e até 75% em queijo Halloumi (Kamleh *et al.*, 2012). Ainda assim, verificou-se que o tratamento de salga NaCl/KCl (1:3) nos queijos São João obteve uma pontuação média final mais satisfatória comparativamente ao

queijo salgado com mistura NaCl/KCl (1:1) e ao queijo experimental salgado totalmente com KCl, este último que foi considerado aceitável para o paladar do consumidor geral.

Relativamente aos queijos experimentais associados à redução gradual simples de cloreto de sódio, verificou-se que uma diminuição de 25% de sal não conferia diferenças apreciáveis comparativamente ao queijo controlo e às modalidades experimentais de substituição globalmente mais aceites. Verificou-se que ao longo da redução isolada de sal, de 50 a 0% NaCl, o sabor amargo aumentou, por vezes de modo significativo ($P<0,05$), sendo extremamente amargo para o queijo isento de sal, o qual foi descrito, por alguns provadores, como “sabor a erva”, tendo sido a modalidade de ensaio com menor aceitação, não apenas no parâmetro do sabor, mas também relativamente à qualidade global ($P<0,05$). Também se observou uma perda na firmeza nos queijos de redução isolada de sal, sendo esta significativa ($P<0,05$) nos queijos totalmente isentos de sal, nomeadamente nos atributos de consistência e pasta. Tal facto pode ser atribuído à aceleração da proteólise ao longo da cura nestes queijos, como foi observado no ponto 3.4 (“*Avaliação das Frações Azotadas na Proteólise*”).

Em suma, os resultados da tabela 3.10 demonstram claramente o sucesso do fabrico de queijos São João com salga por mistura NaCl/KCl e, inclusivamente, com substituição total de cloreto de sódio por cloreto de potássio, provavelmente devido a uma proteólise mais intensa resultante para estes queijos, com um eventual impacto nas características de textura e no sabor e aroma do queijo, pois, como referem Sousa *et al.* (2001) e Yvon & Rijnen (2001), a fração hidrossolúvel resultante engloba a maioria de compostos sápidos, como ácidos, sais, péptidos de baixo peso molecular e aminoácidos livres, e, adicionalmente a alguns compostos voláteis. Este resultado está em consonância com aquele obtido para a prova triangular realizada ao lote B. Resultados satisfatórios semelhantes foram obtidos por outros autores para algumas variedades de queijo, nomeadamente, queijos Cheddar, Gouda, Prato, fundido (americano), Suíço, Cottage, Caciotta, Colby, Camembert, Feta, Kefalograviera e Halloumi (Katsiari *et al.*, 1997,1998; Kamleh *et al.*, 2012). Inclusivamente, queijos Cheddar e Colby de teor reduzido em sódio, mediante substituição com cloreto de potássio, já estão comercialmente disponíveis (Katsiari *et al.*, 1997, 1998). Porém, convém referir que a tentativa de substituição parcial em queijo Appenzell semiduro não foi bem sucedida (Katsiari *et al.*, 1998). De salientar ainda que, nos nossos resultados, a redução isolada de sal em 25% não foi perceptível ao paladar, tal como referido em Cruz *et al.* (2011), e à semelhança do resultado do teste das diferenças obtido para o lote B.

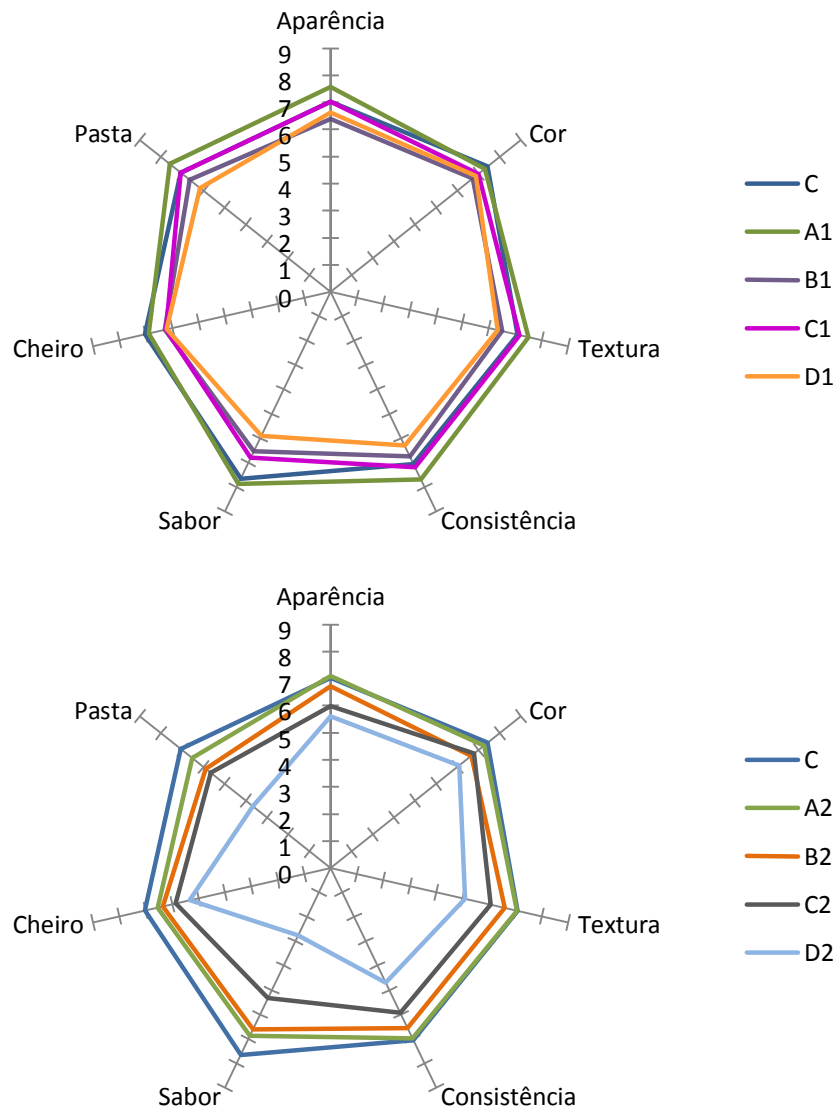


Figura 3.27 – Perfil sensorial obtido no queijo São João relativamente aos tratamentos da salga aplicados aos 17 dias de maturação.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO

O queijo São João do Pico de qualidade bastante aceitável pode ser fabricado utilizando misturas de NaCl/KCl (3:1, 1:1 ou 1:3) ou 100% KCl, em alternativa à salga na massa apenas com NaCl. Os queijos obtidos experimentalmente não divergiram significativamente do queijo controlo no que se refere à composição química (humidade, proteína, matéria gorda e cloretos), evolução da proteólise, contagens microbiológicas e propriedades de textura. Deste modo, o cloreto de sódio pode ser parcial ou totalmente substituído por cloreto de potássio sem efeitos adversos significativos na qualidade global do queijo São João. No geral, uma simples redução em 25% do sal atualmente utilizado na etapa da salga nestes queijos, também é viável, visto terem-se obtido resultados análogos às modalidades de salga por substituição.

A partir das determinações dos elementos de sódio e potássio, verificou-se que a utilização de misturas de salga NaCl/KCl (1:1 e 1:3) no queijo São João do Pico permitiu reduzir o rácio Na/K para um valor muito próximo do recomendado pelos nutricionistas, tendo-se obtido 1,3 e 0,7, em base molecular, respetivamente, aos 17 dias de maturação. Também o queijo São João salgado com 100% KCl corresponde a um alimento de “teor baixo em sódio” por possuir uma quantidade de Na não superior a 120 mg por porção de 100 g queijo, aos 17 dias de cura. De notar que uma redução simples em 25% de cloreto de sódio permite a utilização da menção “teor reduzido em sódio” na rotulagem do queijo, com benefícios para a saúde pública.

Os queijos São João com redução simples do sal mostraram-se significativamente mais ácidos, exibindo, no geral, valores de pH inferiores aos queijos experimentais de redução por substituição e ao queijo controlo, este último, tipicamente ácido. No geral, os queijos experimentais salgados por mistura NaCl/KCl, e no caso particular do lote B, revelaram ser significativamente menos ácidos comparativamente ao queijo convencional.

A análise microbiológica apresentou resultados satisfatórios em todas as modalidades de salga por substituição/redução, evidenciando, contudo algumas fragilidades de ordem higiénica que podem ser corrigidas através das boas práticas de higiene e de laboração.

A redução por substituição parcial ou total de NaCl por KCl ou por redução isolada de NaCl, na manufatura do queijo São João do Pico não influenciou a extensão e profundidade da proteólise ao longo da maturação. Os resultados revelaram que a proteólise foi similar nos queijos experimentais e controlo em todas as fases de maturação, embora se tenha verificado, no geral, uma tendência para maiores índices de extensão da proteólise nas modalidades de salga por substituição, ao longo da maturação, e maiores níveis de profundidade da proteólise, nomeadamente no azoto não proteico, nas modalidades de salga por redução simples gradual.

Foi possível observar, no plano físico, variações significativas aos 17 dias de cura. Todas as modalidades de salga por redução isolada exibiram propriedades de coesividade e adesividade significativamente inferiores aos queijos experimentais por substituição. Verificou-se, também, que a dureza foi significativamente superior nos queijos de redução isolada do sal, a partir de um decréscimo em 25%, comparativamente aos queijos experimentais salgados com mistura NaCl/KCl. De notar que a substituição parcial/total de NaCl por KCl no queijo São João pareceu resultar num perfil de textura similar ao do controlo (100% NaCl).

Não foram encontradas diferenças na aceitação do queijo entre diferentes modalidades de salga de redução por substituição até 75% NaCl, não obstante pequenas diferenças na análise descritiva no que concerne aos atributos da aparência, consistência, sabor e pasta. A análise sensorial revelou características organolépticas agradáveis, consensualmente bem classificadas pelo painel para os queijos de salga por substituição e de redução simples até 50% NaCl, inclusive, sendo que a redução isolada de sal em 25% não foi perceptível ao paladar.

Os resultados sensoriais, conjugados com os resultados químicos, microbiológicos, bioquímicos e de textura, sugerem que o queijo São João pode ser fabricado com sucesso utilizando KCl como substituinte parcial ou total na salga, atualmente realizada com NaCl, ou apenas por recurso a uma simples redução em 25% da quantidade de sal.

Tal como sugerido ao longo da discussão, teria sido de interesse analisar os microrganismos e os parâmetros de textura ao longo da maturação, bem como identificar os compostos moleculares constituintes das frações azotadas por recurso a técnicas instrumentais de electroforese e RP-HPLC, para melhor compreensão dos resultados obtidos no estudo realizado.

Com este trabalho poderá surgir o interesse em desenvolver linhas de investigação semelhantes na tecnologia da salga relativamente a outros queijos nacionais, de tipo tecnológico diferente, para verificar até que nível a redução de sal é exequível nos mesmos.

Na verdade, o queijo utilizado neste estudo, de consumo relativamente limitado dada a sua zona de produção, representa um tipo tecnológico específico de queijo, caracterizado essencialmente pelo efeito conjugado da acidificação e elevado teor em humidade nas propriedades de textura e olfato-gustativas. Neste contexto, o efeito da redução/substituição de sal pode ter implicações diferentes noutros queijos nacionais, de grande consumo ou de origem tradicional, por exemplo, com tipologias tecnológicas substancialmente diferentes, e em que os fenómenos mais importantes são de tipo ou de intensidade diferentes.

Poderão constituir exemplos de estudo queijos com texturas próximas ao queijo estudado, mas com origem diferente, assente sobretudo em proteólise mais extensa e profunda, como são os queijos de Azeitão, Castelo Branco e Serra da Estrela, de leite cru, assim como a queijos de pasta semi-dura ou dura, associados à tipologia do queijo Cheddar, como o queijo São Jorge, ou mesmo outras variedades de queijo, por exemplo o queijo nacional de tipo holandês, conhecido como “flamengo”, que, sendo apresentado sob várias formas, é provavelmente o queijo de maior consumo entre nós e, portanto, com um contributo alimentar muito importante, e que se caracteriza por apresentar uma pasta bem ligada, de textura fechada, medianamente amanteigada, untuosa e uniforme, com alguns olhos, associando os efeitos acidificante e proteolítico dos fermentos lácticos, com algum controlo determinado pela tecnologia de fabrico.

CAPÍTULO 5 - BIBLIOGRAFIA

Agarwal, S., McCoy, D., Graves, W., Gerard, P. D. & Clark, S. (2011). Sodium content in retail Cheddar, Mozzarella, and processed cheeses varies considerably in the United States. *Journal of Dairy Science*. Vol. 94 (3): 1605–1615.

Alvarenga, N. (2008). *Introdução da Tecnologia de Congelação na Produção de Queijo de Ovelha*. Dissertação de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, 164p.

Alvarenga, N., Canada, J. & Sousa, I. (2011). Effect of freezing on the rheological, chemical and colour properties of Serpa cheese. *Journal of Dairy Research*. Vol. 78: 80-87.

Alvarenga, N., Silva, P., Garcia, J.R., Sousa, I. (2008). Estimation of Serpa cheese ripening time using multiple linear regression (MLR) considering rheological, physical and chemical data. *Journal of Dairy Research*. Vol. 75: 233–239.

Aly, M.E. (1995). An attempt for producing low-sodium Feta-type cheese. *Food Chemistry*. Vol. 52: 295-299.

AOAC (1990). ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Washington, DC: AOAC, 1990.

Arenas, R., González, L., Bernardo, A., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. (2004). Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. *Food Control*. Vol. 15: 271-279.

Ayyash, M.M. & Shah, N.P. (2010). Effect of Partial Substitution of NaCl with KCl on Halloumi Cheese during Storage: Chemical Composition, Lactic Bacterial Count, and Organic Acids Production. *Journal of Food Science*. Vol. 75 (6): 525-529.

Ayyash, M.M., Sherkat, F., Francis, P., Williams, R.P.W. & Shah, N.P. (2011). The effect of sodium chloride substitution with potassium chloride on texture profile and microstructure of Halloumi cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. 94 (1): 37-42.

Beuvier, E. & Buchin, S. (2004). Raw Milk Cheeses. In Fox, P.F. (3rd ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1: 319-345. London: Chapman & Hall.

BS ISO 4120 (2004). *Sensory analysis – Methodology – Triangle test*. United Kingdom: The British Standards Institution.

Carvalho, J. D.G., Viotto, W.H., Kuaye, A.Y. (2007). The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*. Vol. 18: 262-267.

Cichoski, A.J., Valduga, E., Valduga, A.T., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M. (2002). Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. *Food Control*. Vol. 13: 329-336.

Correia, M.A., Gomes, A.M., Pintado, M. E., Malcata, F.X. (2008). Os queijos tradicionais na alimentação portuguesa. *Boletim ANIL – Leite I+D+T*, 7: 5-7.

Creamer, L.K. (1985). Water absorption by renneted casein micelles. *Milchwissenschaft*. Vol. 40 (2): 589-591.

Cruz, A. G., Faria, J.A.F., Pollonio, M.A.R. *et al.* (2011). Review: Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 22 (6): 276-291.

Decreto-Lei 126/2005, de 5 de agosto, que complementa o Decreto-Lei n.º 560/99, de 18 de Dezembro, relativamente à indicação dos ingredientes presentes nos géneros alimentícios. D.R. n.º 150, Série I-A de 5 de agosto de 2005.

Decreto-Lei n.º 156/2008, de 7 de agosto, que procede à sétima alteração ao Decreto-Lei n.º 560/99, de 18 de Dezembro, relativo à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios destinados ao consumidor final. D.R. N.º 152, Série I-A de 7 de agosto de 2008.

Decreto-lei n.º 193/2004 de 17 de agosto que transpõe para a ordem jurídica nacional a Diretiva n.º 2003/99/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de novembro, relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos. D.R. n.º 193, Série I-A de 17 de agosto de 2004.

Demott, B.J., Hitchcock, J.J., Sanders, O.G. (1984). Sodium concentration of selected dairy products and acceptability of a sodium substitute in Cottage cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. 67 (7): 1539-1543.

Despacho Normativo 32/96 de 29 de outubro que estabelece as principais características do “Queijo do Pico”.

Drake, S.L., Lopetcharat, K. and Drake, M.A. (2011). Salty taste in dairy foods: Can we reduce the salt? *Journal of Dairy Science*. Vol. 94 (2): 636–645.

Euston, S. R., Piska, I., Wium, H., & Qvist, K. B. (2002). Controlling the structure and rheological properties of model cheeses systems. *Australian Journal of Dairy Technology*. Vol. 57 (1): 145-152.

FDA (2008). Nutrient content claims for the sodium content of foods. Washington, USA: Department of Health and Human Services.

FIL-IDF (2006). *Cheese and processed cheese products. Determination of chloride content. Potentiometric titration method*, Standard 88. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

FIL-IDF (2010). *Cheese and processed cheese products. Determination of total phosphorous content. Molecular absorption spectrometric method*, Standard 33. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

FIL-IDF (2007). *Milk and milk products. Determination of calcium, sodium, potassium and magnesium contents. Atomic absorption spectrometric method*, Standard 119. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

FIL-IDF (2008). *Milk and milk products. Guidance on sampling*. Standard 50. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

FIL-IDF (2008). *Processed cheese products. Determination of nitrogen content and crude protein calculation. Kjeldahl method*. Standard 25. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*. Vol. 72: 1379-1400.

Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. (2004). Cheese: An Overview. In Fox, P.F. (3rd ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1: 1-18. London: Chapman & Hall.

Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (2004). (3rd ed.) *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 2. London: Chapman & Hall.

Freitas, C. & Malcata, F.X. (2000). OUR INDUSTRY TODAY: Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine Protégée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. *Journal of Dairy Science*. Vol. 83: 584-602.

Guinee, T.P. & Fox, P.F. (2004). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In Fox, P.F. (3rd ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1: 207-259. London: Chapman & Hall.

Guinne, T.P. (2004). Salting and the role of the salt in cheese. *International Dairy Journal of dairy Technology*. Vol. 57 (1): 99-109.

Grappin, R., Rank, T.C., Olson, N.F. (1985). Primary proteolysis of cheese during ripening. A review. *Journal of Dairy Science*. Vol. 68: 531-540.

Hayaloglu, A.A., Guven, M., Fox, P.F. (2002). Review: Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese “Beyaz Peynir”. *International Dairy Journal*. Vol. 12: 635-648.

Health and Consumers DG, 2008.

http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/nutrition/documents/compilation_salt_en.pdf

International Dairy Federation - IDF (1991). Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bulletin IDF, 261, 4-8.

International Dairy Federation - IDF (2005). The world market for cheese 1995-2004. Bulletin IDF, 402, 5-18.

International Dairy Federation - IDF (2007). The world situation 2007. Bulletin IDF, 423, 5-18.

ISO 4831 (2006). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique*. Delft, The Netherlands: International Organisation for Standardisation.

ISO 11290-2 (1998)/Amd. 1 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes. Part 2: Enumeration method*. Delft, The Netherlands: International Organisation for Standardisation.

ISO 6579 (2002). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*. Delft, The Netherlands: International Organisation for Standardisation.

ISO 6888-1 (1999). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part1: Technique using Baird-Parker medium*. Delft, The Netherlands: International Organisation for Standardisation.

ISO 6887-1 (1999) *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal solutions*. Delft, The Netherlands: International Organisation for Standardisation.

ISO 8199 (2005). *Water quality – General guide to the enumeration of microorganisms by culture*. Delft, The Netherlands: International Organisation for Standardisation.

Johnson, M.E., Kapoor, R., McMahon, D.J., McCoy, D.R. & Narasimmon, R.G. (2009). Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: scientific and technological aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 8 (3): 252-268.

Kamleh, R., Olabi, A., Toufeili, I., Najm, N.E.O, Younis, T. & Ajib, R. (2012). The effect of substitution of sodium chloride with potassium chloride on the physicochemical, microbiological, and sensory properties of Halloumi cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. 95: 1140-1151.

Karahadian, C., & Lindsay, R. (1984). Flavour and textural properties of reduced-sodium process American cheeses. *Journal of Dairy Science*. Vol. 67(9): 1892-1904.

Katsiari, M.C., Alichanidis, E., Voutsinas, L.P., Roussis, I.G. (2000). Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*. Vol. 10: 635-646.

Katsiari, M.C., Alichanidis, E., Voutsinas, L.P., Roussis, I.G. (2001). Proteolysis in reduced sodium Kefalograviera cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*. Vol. 10: 635-646.

Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Alichanidis, E. & Roussis, I.G (1997). Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*. Vol. 7: 465-472.

Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Alichanidis, E. & Roussis, I.G (1998). Manufacture of Kefalograviera cheese with less sodium by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chemistry*. Vol. 61 (1/2): 63-70.

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, E.H., (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*. Vol. 21 (6): 805-815.

Kuchroo, C. N. & Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*. Vol. 37: 331–335.

Lindsay, R.C., Hargett, S.M., Bush, C.S. (1982). Effect of sodium/potassium (1:1) chloride and low sodium chloride concentrations on quality of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. 65 (3): 360-370.

Machado, E.C., Ferreira, C.L.L.F., Fonseca, L.M., Soares, F.M., Pereira Júnior, F.N. (2004). Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*. Campinas. Vol. 24(4): 516-521.

Martins A.P.L. (2012). Comunicação pessoal.

McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*. Vol. 77: 41-76.

McSweeney, P.L.H. (2004). Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview. *In* Fox, P.F. (3rd ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1: 391-433. London: Chapman & Hall.

McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (2004). Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. *In* Fox, P.F. (3rd ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1: 361-371. London: Chapman & Hall.

Mistry, V.V. & Kasperson, K.M. (1997). Influence of salt on the quality of reduced fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. 81 (5): 1214-1221.

NP 1829 (1982). *Microbiologia Alimentar. Colheita de amostras para análise microbiológica*. Caparica, Portugal: Direção Geral da Qualidade, Instituto Português da Qualidade.

NP 1934 (1986). *Microbiologia Alimentar. Leites e Produtos Lácteos. Contagem de Bolores e Leveduras*. Caparica, Portugal: Direção Geral da Qualidade, Instituto Português da Qualidade.

NP 2104 (1988). *Queijos e queijos fundidos. Determinação do teor de lactose*. Caparica, Portugal: Direção Geral da Qualidade, Instituto Português da Qualidade.

NP 2308 (1986). *Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de Escherichia coli*. Caparica, Portugal: Instituto Português da Qualidade.

NP 4137 (1991). *Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a determinação de Enterobacteriaceae sem revitalização. Técnicas do número mais provável (NMP) e de contagem de colónias*. Caparica, Portugal: Instituto Português da Qualidade.

NP 4400-2 (2002). *Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagens de Estafilococos coagulase positiva (Staphylococcus aureus e outras espécies). Parte 2: Técnica de confirmação de colónias (Método corrente)*. Caparica, Portugal: Instituto Português da Qualidade.

NP 4405 (2002). *Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagens de microrganismos. Contagens de colónias a 30 °C*. Caparica, Portugal: Instituto Português da Qualidade.

O'Callaghan, D.J., Guinee, T.P. (2004). Rheology and Texture of Cheese. In Fox, P.F. (3rd ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1: 511-540. London: Chapman & Hall.

Perry, K.S.P. (2004). Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova*. Vol. 27(2): 293-300.

Phan, V.A., Yven, C., Lawrence, G., Chabanet, C., Reparet, J.M., Salles, C. (2008). In vivo sodium release related to salty perception during eating model cheeses of different textures. *International Dairy Journal*. Vol. 18(9): 956-963.

Pintado, A.I.E., Pinho, O., Ferreira, I.M.P., Manuela, M., Pintado, E., Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. (2008). Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal*. Vol. 18: 631-640.

Portaria n.º 861/84 de 15 de novembro que proíbe a venda e consumo de determinada qualidade de leite e produtos derivados. D.R. n.º 265, Série I-A de 15 de novembro de 1984.

Pripp, A.H., Skeie, S., Isaksson, T., *et al.* (2006). Multivariate modelling of relationships between proteolysis and sensory quality of Präst cheese. *International Dairy Journal*. Vol. 16: 225-235.

Quattrucci, E., Bruschi, L. & Manzi, P. (1997). Nutritional evaluation of typical and Reformulated Italian cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 73 (1): 46-52.

Rank, T.C., Grappin, R., Olson, N.F. (1985). Secondary proteolysis of cheese during ripening. A review. *Journal of Dairy Science*. Vol. 68: 801-805.

Regulamento comunitário n.º 1662/2006 de 6 de novembro que altera o Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. L 320 de 18 de novembro de 2006.

Regulamento comunitário n.º 2073/2005, de 15 de novembro, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. L 338 de 22 de dezembro de 2005.

Regulamento comunitário n.º 1441/2007, de 5 de dezembro, que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de novembro, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. L 322 de 07 de dezembro de 2007.

Reps, A., Wisniewska, K., Kuzmicka, M. (2009). Possibilities of increasing the potassium content of processed cheese spread. *Milchwissenschaft*. Vol. 64 (2): 176-179.

Retificação do Regulamento comunitário n.º 1924/2006, de 20 de dezembro, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. L 12 de 18 de janeiro de 2007.

Rulikowska, A., Kilcawley, K.N., Doolan, I.A. *et al.* (2013). The impact of reduced sodium chloride content on Cheddar cheese quality. *International Dairy Journal*. Vol. 28: 45-55.

Sá, F.V. & Barbosa, M. (1990). O leite e os seus produtos. 5.^a d. Clássica Editora, 520p.

Schroeder, C.L., Bodyfelt, F.W., Wyatt, C.J., McDaniel, M.R. (1988). Reduction of sodium chloride in cheddar cheese: effect on sensory, microbiological, and chemical properties. *Journal of Dairy Science*. Vol. 71(8): 988-993.

Serras, M. (2010). A importância do leite na alimentação humana. *Curso avançado da qualidade do leite*. Faculdade de Medicina de Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1 e 2 de Outubro.

Silva, M.L.C. (2000). Estudo da maturação em queijo São Jorge – caracterização do perfil proteolítico. Dissertação de Doutoramento (documento provisório), Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11: 327–345.

Tavaria, F.K., Franco, I., Carballo, F.J., Malcata, F.X. (2003). Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*. Vol. 13: 537–545.

Tavaria, F.K., Reis, P.J.M., Malcata, F.X. (2006). Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*. Vol. 16: 895-902.

Temelli, S., Anar, S., Sen, C., Akyuva, P. (2006). Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. *Food Control*. Vol. 17: 856-861.

Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A, Fox, P.F. (2004). Proteolysis in Cheese Ripening. In Fox, P.F. (3rd ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1: 391-433. London: Chapman & Hall.

Var, I., Erginkaya, Z., Güven, M., Kabak, B. (2006). Effects of antifungal agent and packaging material on microflora of Kashar cheese during storage period. *Food Control*. Vol.17: 132-136.

Watanabe, F.S., & Olsen, S.R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* Vol. 29: 677-678.

Williams, P., Mc Mahon, A. & Boustead, R. (2003=). A case study sodium reduction in breakfast cereals and the impact on the pick the tick food information program in Australia. *Health Promotion International*. Vol. 18 (10): 51-56.

Wyatt, C.J. (1983). Acceptability of reduced sodium in breads, Cottage cheese, and pickles. *Journal of Food Science*. Vol. 48: 1300-1302.

Yucel, N. & Ulusoy, H. (2006). A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. *Food Control*. Vol. 17: 383–388.

Yvon, M. & Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*. Vol. 11: 185-201.

Zanardi, E., Ghidini, S., Conter, M., Ianieri, A. (2010). Mineral composition of Italian salami and effect of NaCl partial replacement on compositional, physico-chemical and sensory parameters. *Meat Science*. Vol. 86: 742–747.

ANEXO I.A – Ficha de provas do teste do triângulo.

QUESTIONÁRIO ANÁLISE SENSORIAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Prova Triangular

Nome: _____ Data: _____

SexoM ☐ F ☐**Idade**15-30 anos ☐ Entre 31 a 50 anos ☐ Mais de 51 anos ☐Produto: **Queijos**Instruções:

1) Tem à sua frente três amostras. Prove as amostras da **esquerda para a direita**. Duas delas são iguais; uma é diferente. Indique o número da **amostra diferente no espaço assinalado**. Caso não tenha a certeza, registre o seu melhor palpite.

2) Pode colocar as suas observações no espaço reservado aos Comentários relativamente ao modo como deu a sua resposta (por exemplo, se as diferenças que verificou foram em função do sabor, textura (firmeza, maciez), cheiro (odor) e/ou aparência. Ainda no mesmo espaço, pode acrescentar outras observações que julgue serem importantes.

OBRIGADO PELA SUA PARTICIPAÇÃO.

A amostra que difere tem o N°

Comentários: _____

ANEXO I.B – Teste de Aceitação ao queijo de São João.

Nome: _____ Data: _____

SexoM ☐ F ☐**Idade**15-30 anos ☐Entre 31 e 51 anos ☐Mais de 51 anos ☐

Por favor, avalie a amostra, utilizando a escala seguinte para descrever o quanto gostou ou desgostou dos queijos São João.

- 1 – Desgosto totalmente
- 2 – Desgosto muito
- 3 – Desgosto moderadamente
- 4 – Desgosto ligeiramente
- 5 – Não gosto, nem desgosto
- 6 – Gosto ligeiramente
- 7 – Gosto moderadamente
- 8 – Gosto muito
- 9 – Gosto totalmente

Assinale com um X a posição na escala que melhor traduza a sua opinião.

Obrigada pela sua participação!

Amostra n.º _____

QUALIDADE GLOBAL:

Aparência

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Cor

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

(branca a amarela
ténue)

Textura

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

(irregular, pouco
compacta)

Consistência

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

(mole, pastosa)

Sabor

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Cheiro

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Pasta

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

(amanteigada)

Comentários^(*):

--

^(*) Descreva possíveis defeitos que tenha detectado ao longo da apreciação, relativos à aparência (p. ex.: seca, húmida, fissuras), pasta (p. ex.: presença de olhos, quebradiça, esponjosa, pastosa, dura) e sabor (p. ex.: ácido, amargo, metálico, salgado, picante, fermentado e azedo).

